

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 7 月 31 日 (31.07.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/062243 A1

(51) 国際特許分類⁷: C07D 493/22, 311/86, 493/04, 493/08, 493/10, A61K 31/35, 31/352, A61P 9/10, 25/00, 25/14, 25/16, 25/28, 27/06, 43/00, C12P 17/18 // C07M 7:00

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/00567

(22) 国際出願日: 2003 年 1 月 22 日 (22.01.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-15216 2002 年 1 月 24 日 (24.01.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 住友製薬株式会社 (SUMITOMO PHARMACEUTICALS CO., LTD.) [JP/JP]; 〒541-8510 大阪府 大阪市 中央区道修町 2 丁目 2-8 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 熊谷 和夫

(KUMAGAI, Kazuo) [JP/JP]; 〒669-1321 兵庫県 三田市 けやき台 3 丁目 53-6 Hyogo (JP). 細谷 宜生 (HOSOTANI, Nobuo) [JP/JP]; 〒662-0831 兵庫県 西宮市 丸橋町 4-15-322 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 五十部 穰 (ISOBE, Yutaka); 〒554-0022 大阪府 大阪市 此花区春日出中 3 丁目 1-9 8 住友製薬株式会社 知的財産部内 Osaka (JP).

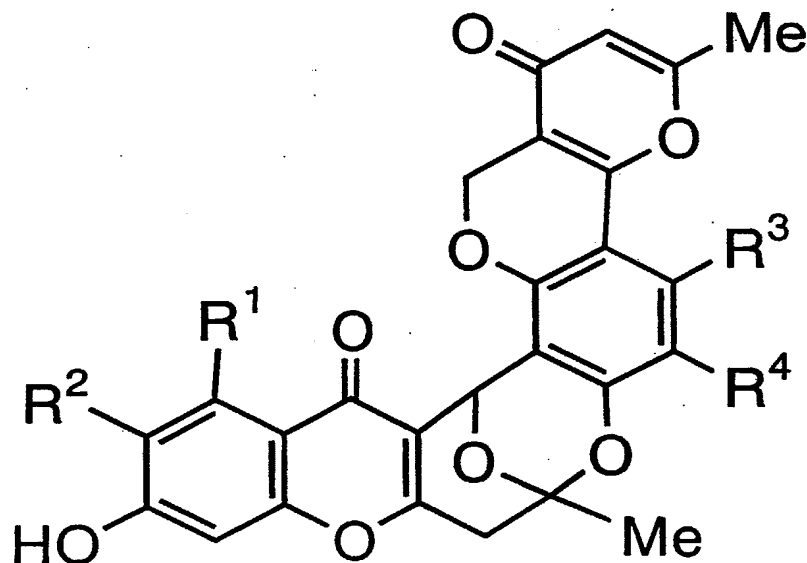
(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,

[続葉有]

(54) Title: NOVEL COMPOUNDS AS SEMAPHORIN INHIBITORS

(54) 発明の名称: セマフォリン阻害剤としての新規化合物



(57) Abstract: Compounds represented by the general formula (1) or pharmaceutically acceptable salts thereof, which exhibit semaphorin-inhibitory activity and are therefore useful as preventive or therapeutic agents for neuropathic or neurodegenerative diseases: (1) wherein R¹ and R³ are each independently hydrogen or carboxyl; and R² and R⁴ are each independently hydrogen or hydroxyl.

[続葉有]

WO 03/062243 A1



GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI
特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

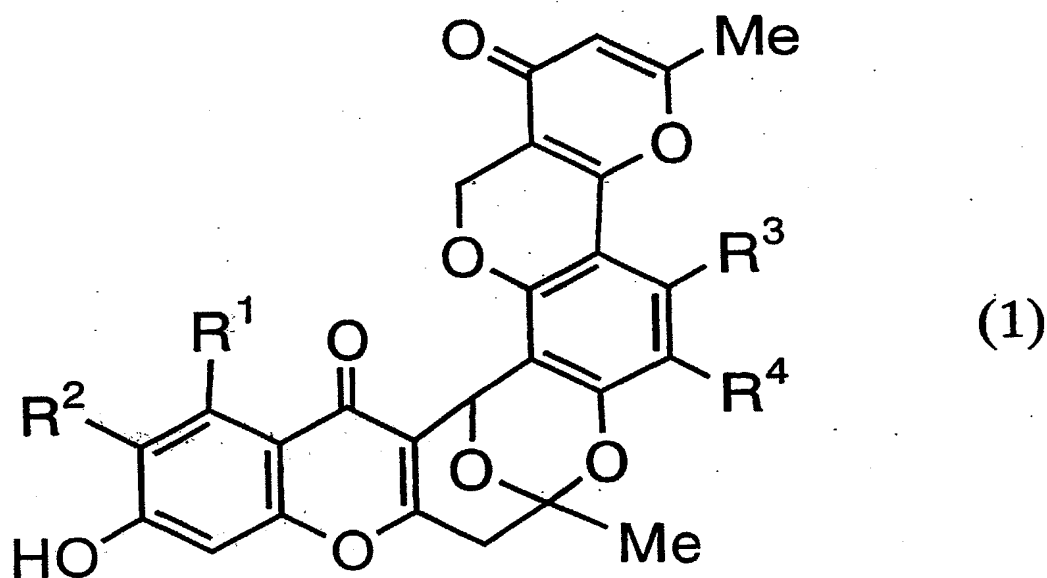
— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

下記一般式 (1)



(式中、R¹およびR³は、独立して、水素原子またはカルボキシル基を表し、R²およびR⁴は、独立して、水素原子または水酸基を表す。)

で表される化合物、またはその薬学上許容される塩等で、神経傷害疾患や神経変性疾患の予防または治療剤として有用なセマフォリン阻害活性を有する化合物を提供する。

明細書

セマフォリン阻害剤としての新規化合物

5 技術分野

本発明は、セマフォリン阻害活性を有する新規な化合物、該化合物の微生物学的製造方法、および該化合物を有効成分として含有する神経再生促進剤等に関する。

背景技術

- 10 神経細胞は成体において分裂能を持っていない特殊な組織である。そのため一旦障害を受けると長期にわたって障害が続く。特に脳や脊髄といった中枢神経系では全く再生能がない。脊髄損傷に代表される外因性の傷害やアルツハイマー病、パーキンソン病といった神経変性疾患に対する治療方法がないことも、中枢神経における再生能が無いことが一つの原因になっているといえることができる。他方、末梢神経は再生能
- 15 を有しており、一旦切断された後も軸索が再生し機能が回復する。しかしこの場合にも再生に要する期間は数ヶ月から1年以上と非常に長時間を要し、患者にとっての苦痛は大きい。更にこのように再生に長期間を要するために、その間に神経細胞が死滅し機能回復に至らない場合も多い。このように再生能を有する末梢神経の場合も、脳や脊髄といった中枢神経系の環境では全く伸長することはできない。そのため、中枢
- 20 神経系には神経の伸長を阻止する物質が存在しているとされている。この中枢神経系に存在する神経再生阻害物質を抗体などで抑制すると一部ではあるが、中枢での神経再生が起こり、機能の回復も見られる。最近、この中枢神経再生阻害因子としてNogoが発見された (Nature 403, 434, 2000、Nature 403, 439, 2000)。しかし、Nogoを阻害することによって、再生する神経線維は一部であり、他の再生阻害物質が存在す
- 25 るのではないかと考えられているが、インビボで神経の再生阻害に働いている因子は、これまで明らかにされていない。

ところで、セマフォリンは、もともと発生期におけるバツタの神経系形成に関係する因子としてその遺伝子が単離されたものであるが、その後、線虫、魚、哺乳類さらにはある種のウイルスなどにも分布する大きな遺伝子ファミリーを形成していることが報告され、現在ではセマフォリン遺伝子は構造上8つの遺伝子サブファミリー、クラス、に分類されている (Cell 97, 551, 1999)。セマフォリンは神経成長円錐を退縮させ軸索の伸長を抑制する因子として同定された内因性のタンパク質であり、これまでに約20種の分子種が知られている (Cell 97, 551, 1999) が、多くのセマフォリンファミリーの大部分の機能について詳しいことはわかっていない。最も良く研究されているのがクラス3型と呼ばれるサブファミリーの遺伝子群であり、これらの翻訳産物はすべて分泌型蛋白質である。これらの遺伝子がコードする蛋白質はインビトロで強い神経突起伸長抑制活性、成長円錐退縮活性を有していることが知られているが、ある条件下では神経突起伸長に誘引的に作用するとの報告もある。中でも最も良く研究されているのがセマフォリン3A (Sema 3A) (Cell 75, 217, 1993, Cell 75, 1389, 1993) であり、この蛋白は10 pMという低濃度で短時間のうちに培養神経細胞の成長円錐退縮を誘発する。セマフォリンのインビボでの機能を解析する研究として、Sema 3Aの受容体の一つのコンポーネントであるニューロピリン-1のノックアウトマウスの研究がなされている (Neuron 19, 995, 1997)。当該ノックアウトマウスは胎生致死であるが、三叉神経など一部の神経系の走行異常、血管形成異常が起こることが知られている。一方、Sema 3Aのノックアウトマウスでも同様の神経系の走行異常は認められるが、大きな異常も無く成体にまで発育する個体もあるとされており、生体内でのSema 3Aの機能については未だ不明な点も多い。

その他セマフォリンに関しては、セマフォリンW、セマフォリンY、セマフォリンZに対する抗体等のアンタゴニストやアンチセンスヌクレオチドを中枢神経の再生促進剤とすること (W098/15628, W098/11216, W098/20928) や、神経細胞とヒトコラプシンに特異的に結合する抗体とを接触させることにより、神経突起成長を誘導する方法 (米国特許第5416197号明細書) が知られている。しかし、セマフォリンを

特異的に阻害する低分子化合物は、これまで全く知られていなかった。

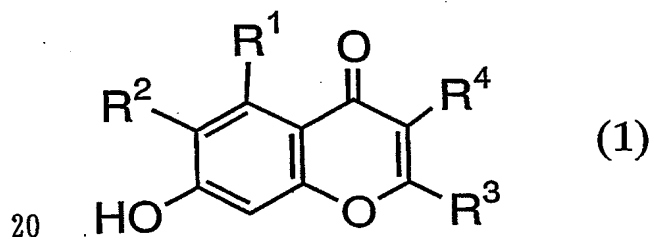
発明の開示

本発明の課題は、セマフォリン阻害活性を有する新規な化合物、該化合物の微生物学的製造方法、および該化合物を有効成分として含有する神経再生促進剤等を提供することにある。

セマフォリンは多くの作用を有していると考えられ、一部ではセマフォリンが神経の発生のみでなく再生にも関与しているとの考えもあったが、実際のところは全くわかっていなかった。本発明者らは、ペニシリウム・エスピー (Penicillium sp.) SPF-3059株の培養物中に見い出される化合物、SPF-3059-1等がセマフォリン阻害活性を有することを見い出すとともに、該化合物が、インビボにおいて、神経再生を促進することを明らかにした。更に、SPF-3059株の培養物を単離精製し、インビトロでセマフォリンの活性を阻害する物質をスクリーニングすることによって、セマフォリン阻害活性を有する新規な化合物を見出した。本発明は、上記の知見に基づいて、完成するに至ったものである。

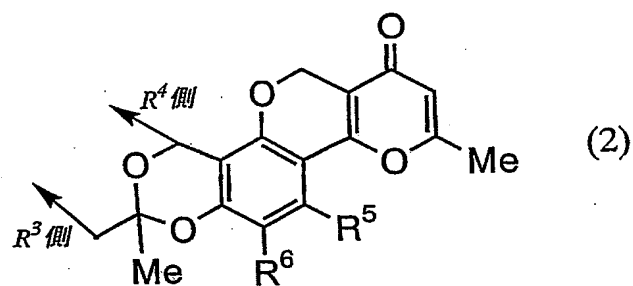
すなわち、本発明は、

[1] 一般式(1)で表される化合物、またはその薬学上許容される塩。



[式中、 R^1 は水素原子またはカルボキシル基を表し、 R^2 は水素原子または水酸基を表し、 R^3 および R^4 は以下の [I] ~ [IX] のいずれかを表す。

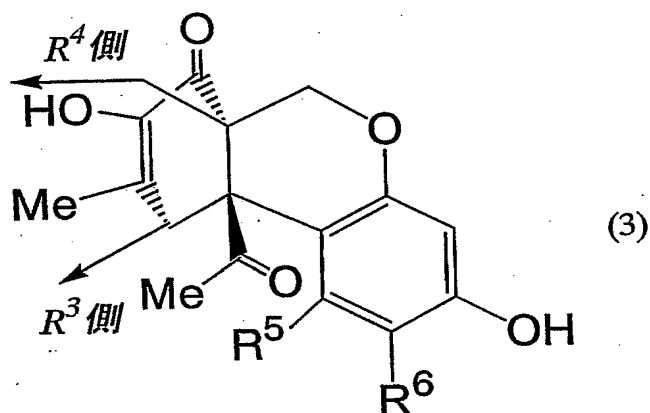
[I] R^3 および R^4 は結合して、式(2)：



(式中、 R^5 は水素原子またはカルボキシル基を表し、 R^6 は水素原子または水酸基を表す。)

で表される2価基を表す。

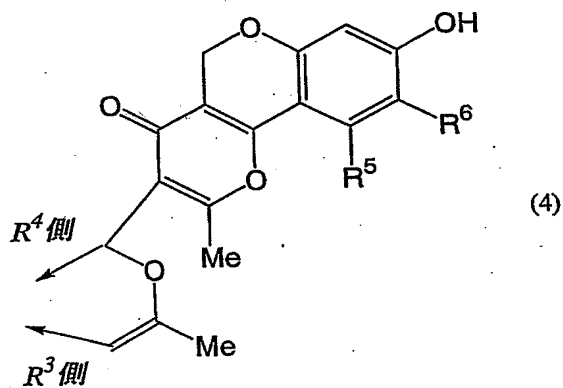
5 [II] R^3 および R^4 は結合して、式(3)：



(式中、 R^5 および R^6 は前記と同義である。)

で表される2価基を表す。

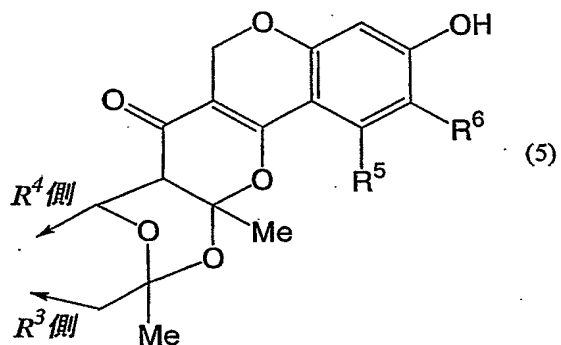
[III] R^3 および R^4 は結合して、式(4)：



(式中、 R^5 および R^6 は前記と同義である。)

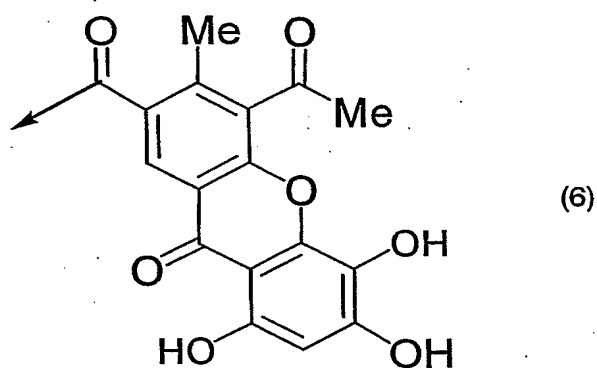
で表される2価基を表す。

[IV] R^3 および R^4 は結合して、式(5) :



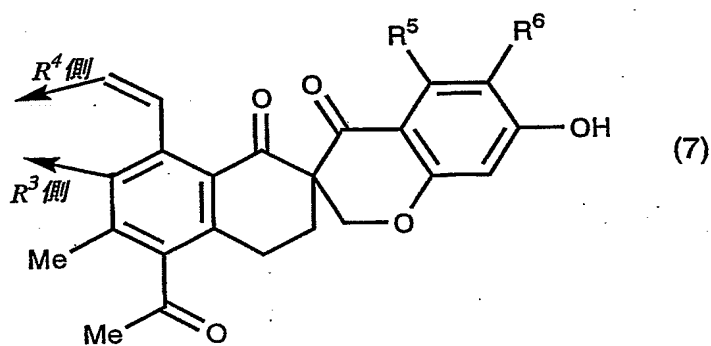
[式中、 R^5 および R^6 は前記と同義である。]
で表される2価基を表す。

5 [V] R^3 は水素原子を表し、 R^4 は式(6) :



で表される基を表す。

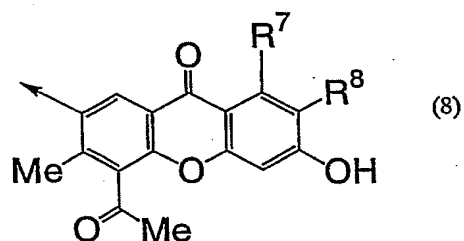
[VI] R^3 および R^4 は結合して、式(7) :



10 (式中、 R^5 および R^6 は前記と同義である。)

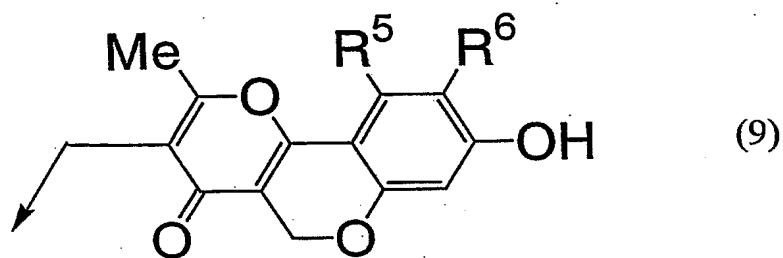
で表される2価基を表す。

[VII] R^3 は式(8) :



(式中、 R^7 は水素原子またはカルボキシル基を表し、 R^8 は水素原子または水酸基を表す。)

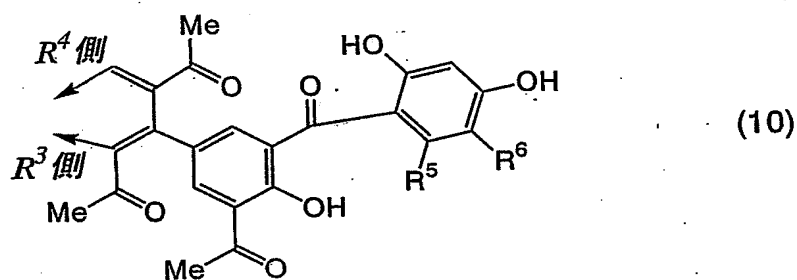
で表される基を表し、 R^4 は式(9)：



(式中、 R^5 及び R^6 は前記と同義である。)

で表される基を表す。

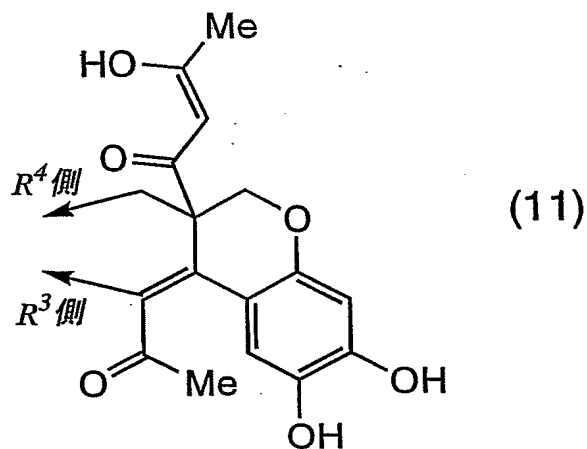
[VIII] R^3 および R^4 は結合して、式(10)：



(式中、 R^5 および R^6 は前記と同義である。)

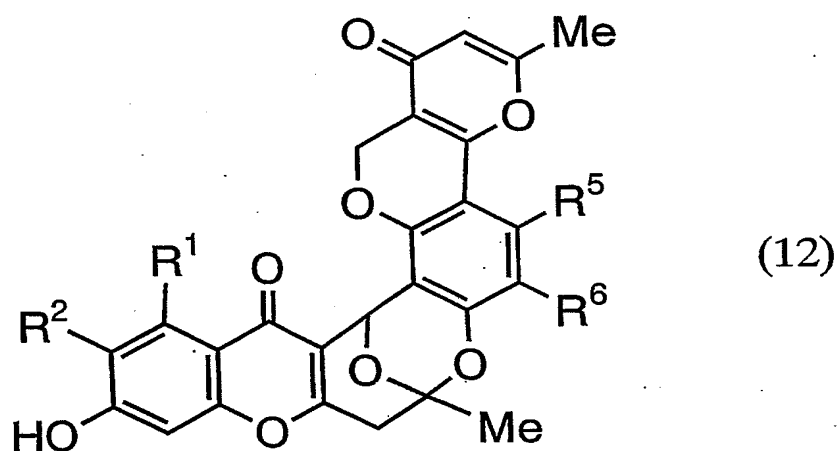
で表される2価基を表す。

[IX] R^3 および R^4 は結合して、式(11)：



で表される2価基を表す。]

[2] 一般式 (12) :



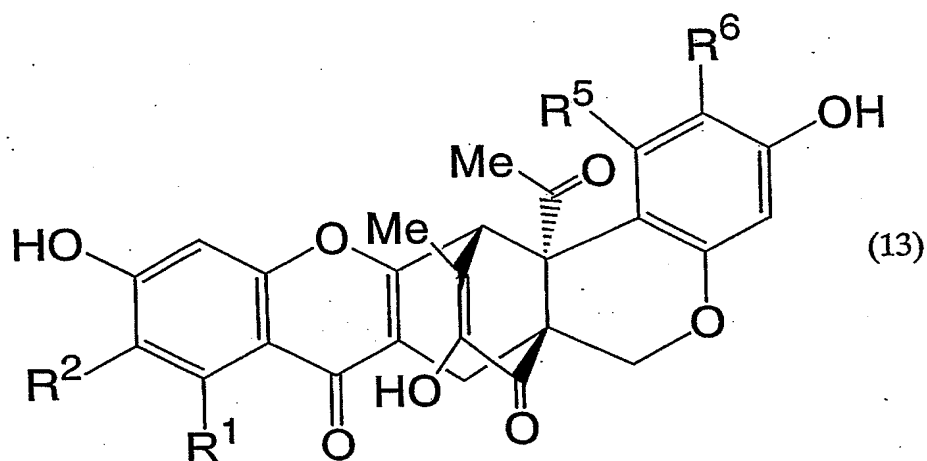
(式中、 R^1 、 R^2 、 R^5 および R^6 は、上記 [1] と同義である。)

で表される、上記 [1] 記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

[3] 一般式 (12) において、 R^1 および R^5 が、カルボキシ基であり、 R^2 が水酸基又は水素原子であり、 R^6 が水酸基である、上記 [2] 記載の化合物、または

10 その薬学上許容される塩。

[4] 一般式 (13) :

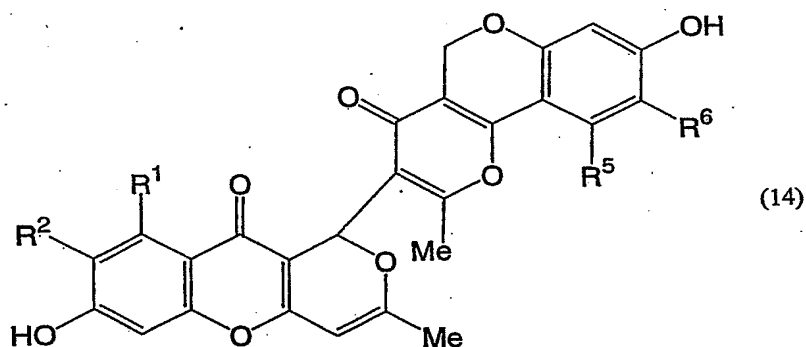


(式中、 R^1 、 R^2 、 R^5 および R^6 は上記 [1] と同義である。)

で表される、上記 [1] 記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

[5] 一般式 (13) において、 R^1 および R^5 がカルボキシ基であり、 R^2 および R^6 が水酸基である、上記 [4] 記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

[6] 一般式 (14) :



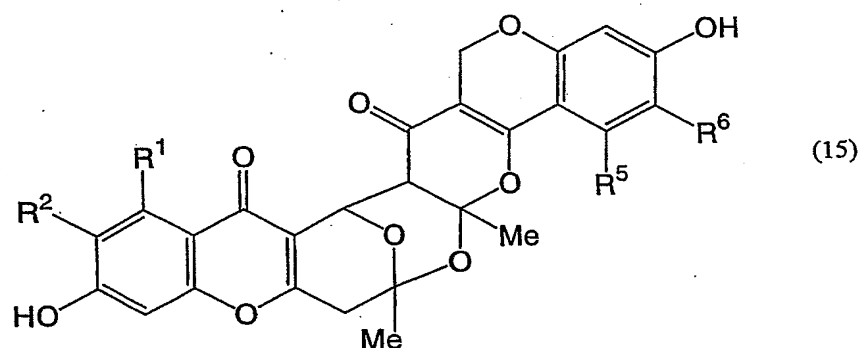
[式中、 R^1 、 R^2 、 R^5 および R^6 は上記 [1] と同義である。]

10 で表される上記 [1] 記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

[7] 一般式 (14) において、 R^1 および R^5 がカルボキシ基であり、 R^2 および R^6 が水酸基である、上記 [6] 記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

[8] 一般式 (15) :

9

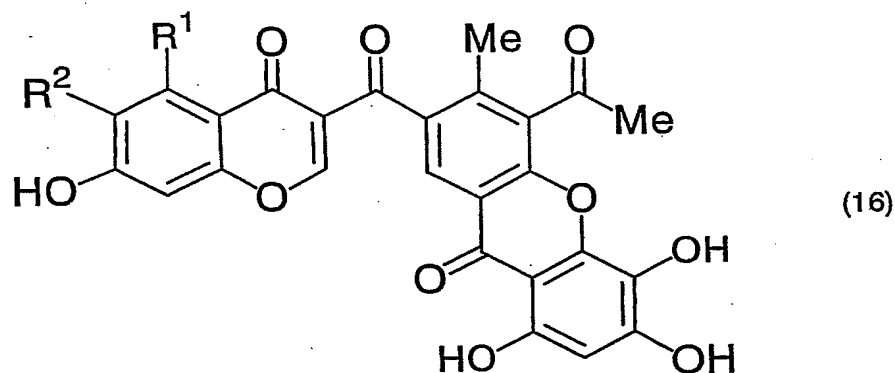


(式中、 R^1 、 R^2 、 R^5 および R^6 は上記〔1〕と同義である。)

で表される上記〔1〕記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

- 〔9〕 一般式(15)において、 R^1 および R^5 がカルボキシ基であり、 R^2 および R^6 が水酸基である、上記〔8〕記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

〔10〕 一般式(16)：

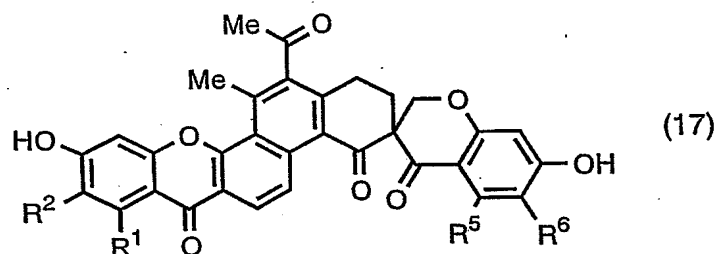


(式中、 R^1 および R^2 は上記〔1〕と同義である。)

- 10 で表される上記〔1〕記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

〔11〕 一般式(16)において、 R^1 が、カルボキシ基を表し、 R^2 が、水酸基を表す上記〔10〕記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

〔12〕 一般式(17)：

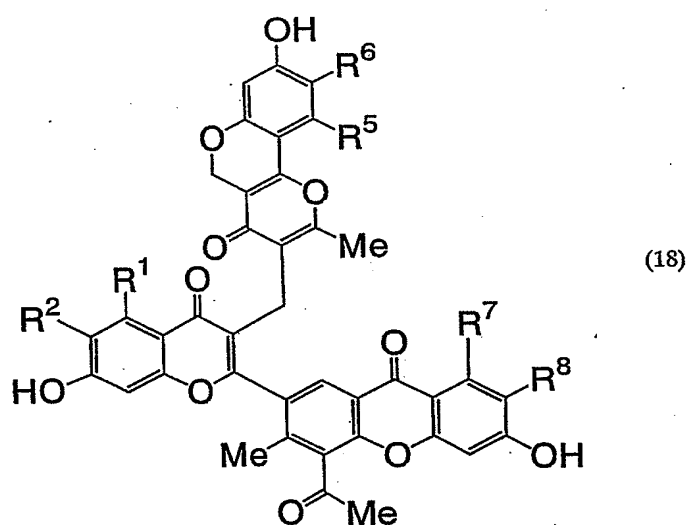


(式中、 R^1 、 R^2 、 R^5 及び R^6 は、上記 [1] と同義である。)

で表される上記 [1] 記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

[13] 一般式 (17) において、 R^1 および R^5 がカルボキシ基を表し、 R^2 および R^6 が水酸基を表す、上記 [11] 記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

[14] 一般式 (18) :



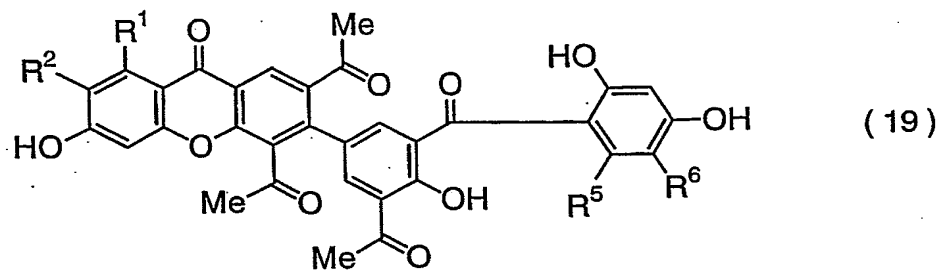
10 (式中、 R^1 、 R^2 、 R^5 、 R^6 、 R^7 および R^8 は上記 [1] と同義である。)

で表される上記 [1] 記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

[15] 一般式 (18) において、 R^1 および R^5 はカルボキシ基であり、 R^2 、 R^6 および R^8 が水酸基である、上記 [14] 記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

15 [16] 一般式 (18) において、 R^7 が水素原子である、上記 [15] 記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

[17] 一般式 (19) :



(式中、R¹、R²、R⁵およびR⁶は上記 [1] と同義である。)

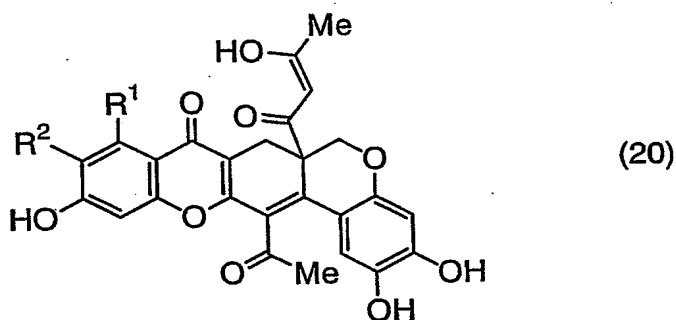
で表される上記 [1] 記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

- 5 [18] 一般式 (19) において、R²およびR⁶が水酸基である、上記 [17] 記載の化合物、又はその薬学上許容される塩。

[19] 一般式 (19) において、R⁵がカルボキシ基である、上記 [18] 記載の化合物、又はその薬学上許容される塩。

- 10 [20] 一般式 (19) において、R¹がカルボキシ基である、上記 [19] 記載の化合物、又はその薬学上許容される塩。

[21] 一般式 (20) :



(式中、R¹及びR²は、上記 [1] と同義である。)

で表される上記 [1] 記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

- 15 [22] 一般式 (20) において、R¹がカルボキシ基であり、R²が水酸基である、上記 [21] 記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

[23] ペニシリウム属に属するSPF-3059株より得ることができ、下記の物理的性質および化学的性質を有し、かつセマフォリン阻害活性を有する化合物。

(a) 高速電子衝撃質量スペクトル m/z 値 $(M+H)^+$: 545;

(b) 分子式: $C_{28}H_{16}O_{12}$;

(c) 紫外可視吸収スペクトル λ_{max} (メタノール中) nm (ϵ): 213(41700)、286(29500)、338sh(14900)、429sh(6500);

5 (d) 赤外吸収スペクトル ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3358、3073、1700、1674、1631、1464、1276、1248;

(e) 1H 核磁気共鳴スペクトル(DMSO- d_6 中、500 MHz): スペクトルのチャートを示す;

10 (f) ^{13}C 核磁気共鳴スペクトル(DMSO- d_6 中、125 MHz): スペクトルのチャートを示す;

[24] ペニシリウム属に属するSPF-3059株より得ることができ、下記の物理的性質および化学的性質を有し、かつセマフォリン阻害活性を有する化合物。

(a) 高速電子衝撃質量スペクトル m/z 値 $(M+H)^+$: 561;

(b) 分子式: $C_{28}H_{16}O_{13}$;

15 (c) 紫外可視吸収スペクトル λ_{max} (メタノール中) nm (ϵ): 219(34300)、257(28900)、311(28600)、404(14600)、450(14400);

(d) 赤外吸収スペクトル ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3154、1657、1605、1468、1279;

20 (e) 1H 核磁気共鳴スペクトル(DMSO- d_6 中): スペクトルのチャートを第3図に示す;

(f) ^{13}C 核磁気共鳴スペクトル(DMSO- d_6 中): スペクトルのチャートを第4図に示す;

[25] ペニシリウム属に属するSPF-3059株より得ることができ、下記の物理的性質および化学的性質を有し、かつセマフォリン阻害活性を有する化合物。

25 (a) 高速電子衝撃質量スペクトル m/z 値 $(M+H)^+$: 669;

(b) 分子式: $C_{34}H_{20}O_{15}$;

(c) 紫外可視吸収スペクトル λ_{max} (メタノール中) nm (ϵ): 213(5460

0)、235sh(39400)、312(31300)、350(24200) ;

(d) 赤外吸収スペクトル ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 3348、1766、1707、1644、1588、1464、1301 ;

(e) ^1H 核磁気共鳴スペクトル(DMSO-d₆中、500MHz) : スペクトルのチャー

5 トを第5図に示す ;

(f) ^{13}C 核磁気共鳴スペクトル(DMSO-d₆中、125MHz) : スペクトルのチャー
トを第6図に示す ;

[26] ペニシリウム属に属するSPF-3059株より得ることができ、下記の物理的性質および化学的性質を有し、かつセマフォリン阻害活性を有する化合物。

10 (a) 高速電子衝撃質量スペクトル m/z 値 ($M+H$)⁺ : 549 ;

(b) 分子式 : $\text{C}_{28}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$;

(c) 紫外可視吸収スペクトル λ_{\max} (メタノール中) nm (ϵ) : 227(30200)、282sh(13500)、315(13900)、356(11000) ;

15 (d) 赤外吸収スペクトル ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 3396、1688、1662、1622、1470、1294 ;

(e) ^1H 核磁気共鳴スペクトル(DMSO-d₆中、500MHz) : スペクトルのチャー
トを第7図に示す ;

(f) ^{13}C 核磁気共鳴スペクトル(DMSO-d₆中、125MHz) : スペクトルのチャー
トを第8図に示す ;

20

[27] 上記[1] ~ [26]のいずれか記載の化合物、またはその薬学上許容される塩を有効成分として含有することを特徴とするセマフォリン阻害剤。

[28] セマフォリンが、クラス3型セマフォリンであることを特徴とする、上記
[27] 記載のセマフォリン阻害剤。

25 [29] クラス3型セマフォリンが、セマフォリン3Aであることを特徴とする、
上記[28] 記載のセマフォリン阻害剤。

[30] セマフォリンが、クラス6型セマフォリンであることを特徴とする、[2

7] 記載のセマフォリン阻害剤。

[3 1] クラス6型セマフォリンが、セマフォリン6 Cであることを特徴とする、
上記[3 0] 記載のセマフォリン阻害剤。

5 [3 2] 上記[2 7] ~ [3 1] のいずれか記載のセマフォリン阻害剤を有効成分
として含有することを特徴とする、神経伸長反発因子阻害剤。

[3 3] 上記[2 7] ~ [3 1] のいずれか記載のセマフォリン阻害剤を有効成分
として含有することを特徴とする、成長円錐退縮活性及び/又はコラーゲンゲル中での
神経伸長阻害活性の抑制作用を有する薬剤。

10 [3 4] 上記[2 7] ~ [3 1] のいずれか記載のセマフォリン阻害剤を有効成分
として含有することを特徴とする、神経再生促進剤。

[3 5] 上記[2 7] ~ [3 1] のいずれか記載のセマフォリン阻害剤を有効成分
として含有することを特徴とする神経障害疾患及び/又は神経変性疾患の予防若し
くは治療剤。

15 [3 6] 上記[2 7] ~ [3 1] のいずれか記載のセマフォリン阻害剤を有効成分
として含有することを特徴とする、脊髄神経の損傷及び/又は末梢神経の損傷を伴う
疾患の予防若しくは治療剤。

20 [3 7] 上記[2 7] ~ [3 1] のいずれか記載のセマフォリン阻害剤を有効成分
として含有することを特徴とする、嗅覚異常症、外傷性神経傷害、脳梗塞性神経障
害、顔面神経麻痺、糖尿病性神経症、緑内障、網膜色素変性症、アルツハイマー病
、パーキンソン病、神経変性疾患、筋発育不全性側索硬化症、筋萎縮性側索硬化
症、ハンチントン病、脳梗塞、又は外傷性神経変性疾患の予防若しくは治療剤。

[3 8] ペニシリウム属に属する微生物を培養して、その培養物から化合物を
採取することを特徴とする、上記[1] ~ [2 6] のいずれか記載の化合物、その薬
学上またはその薬学上許容される塩の製造方法。

25 [3 9] ペニシリウム属に属する微生物が、ペニシリウム・エスピー (Penicil
lium sp.) S P F - 3 0 5 9 株であることを特徴とする上記[3 8] 記載の製造
方法。

図面の簡単な説明

第1図は、SPF-3059-10の ^1H -NMRスペクトル ($\text{DMSO}-d_6$) を示す図である。

第2図は、SPF-3059-10の ^{13}C -NMRスペクトル ($\text{DMSO}-d_6$)

5 を示す図である。

第3図は、SPF-3059-18の ^1H -NMRスペクトル ($\text{DMSO}-d_6$) を示す図である。

第4図は、SPF-3059-18の ^{13}C -NMRスペクトル ($\text{DMSO}-d_6$) を示す図である。

10 第5図は、SPF-3059-31の ^1H -NMRスペクトル ($\text{DMSO}-d_6$) を示す図である。

第6図は、SPF-3059-31の ^{13}C -NMRスペクトル ($\text{DMSO}-d_6$) を示す図である。

第7図は、SPF-3059-41の ^1H -NMRスペクトル ($\text{DMSO}-d_6$) を示す図である。

第8図は、SPF-3059-41の ^{13}C -NMRスペクトル ($\text{DMSO}-d_6$) を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

- 20 本発明において、セマフォリンとは、およそ500アミノ酸残基からなる類似構造のセマフォリンドメインを有する蛋白質の総称であり (Neuron 14, 941-948, 1995)、現在までに約20種以上が報告されているが、これら公知のセマフォリンに限定されるものではない。かかるセマフォリンとしては、ヒト等の哺乳類のセマフォリン、好ましくは文献 (Cell 97, 551, 1999) において定義されたクラス3型、4型、5型
- 25 又は6型のセマフォリン、更に好ましくはクラス3型又はクラス6型セマフォリンを例示することができ、最も好ましくはクラス3型セマフォリンにおいてはセマフォリン3A (Cell 75, 217, 1993, Cell 75, 1389, 1993) を、またクラス6型セマフォリ

ンにおいてはセマフォリン 6 C (国際公開第98/11216号パンフレット、Moll. Cell. Neurosci. 13, 9-23(1999)) を例示することができる。これらセマフォリンをコードする遺伝子の配列情報は、GenBankデータベースや前記文献等において公開されている。

また、本発明におけるセマフォリンには、天然型・組換え型のタンパク質に限ることなく、膜結合型セマフォリンの細胞外ドメインのみを発現可溶化させたもの、抗体やアルカリホスファターゼなどの他のタンパク質との融合タンパク質、あるいはヒスタグやフラグなどのタグを付けたもの、さらには一部のアミノ酸を欠失、置換、付加させた変異体なども含まれる。

10 例えば、セマフォリン 6 C (Sema 6 C) は膜結合型タンパク質であり、Sema 6 Cの有する活性の促進・抑制作用を利用して阻害剤の活性を測定する場合等においては、通常Sema 6 Cの細胞外ドメインが使用される。Sema 6 Cの細胞外ドメインには2つのアイソフォームが知られているが(国際公開第98/11216号パンフレット及びMoll. Cell. Neurosci. 13, 9-23(1999))、そのいずれも成長円錐退縮活性を有している。かかるSema 6 Cの細胞外ドメインと、マーカートンパク質及び/又はペプチドタグとを結合させた融合タンパク質も、Sema 6 C活性を損なわない限り、被験物質の活性を測定する場合等において有利に用いることができ、マーカートン
15 10 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 858

特に制限されるものではないが、好ましくは中枢及び／又は末梢における神経再生促進作用を有する化合物、より好ましくはセマフォリンの有する成長円錐退縮活性及び／又はコラーゲンゲル中での神経伸長阻害活性の抑制作用を有する化合物、さらに好ましくはセマフォリンの有する成長円錐退縮活性とコラーゲンゲル中での神経伸長阻害活性の両方に対して抑制作用を有する化合物を挙げることができる。

中枢及び／又は末梢における神経再生促進作用とは、脳及び脊髄などからなる中枢組織、及び／又は該中枢組織以外の周辺・末梢部である体表や体内の諸器官である末梢組織における神経の再生を促進する作用を言う。ここで中枢における神経再生促進作用には、網膜神経や大脳皮質神経のような、中枢領域にある神経細胞体から軸索を出し同じく中枢領域にある他の神経細胞に投射する神経の再生促進作用のみならず、嗅神経、後根神経節感覚神経の中枢性線維等の、末梢に存在する神経細胞体から出る神経であっても、神経軸索が再生される環境が中枢組織であるときの神経再生促進作用も含まれる。また、末梢における神経再生促進作用としては、末梢にある神経細胞体から出て末梢組織の中を伸びる神経の再生促進作用のみならず、中枢領域（脳及び脊髄など）にある神経細胞体から出る神経であっても、再生される環境が末梢組織であるときの神経再生促進作用も含まれる。後者としては具体的に、脊髄運動神経、交感神経・副交感神経といった自律神経系の節前神経等の神経再生促進作用を例示することができる。また坐骨神経のように、前記の両方の神経を含む神経の再生促進作用も含まれる。そして、本発明のセマフォリン阻害剤としては、中枢及び末梢における神経再生促進作用を有する化合物が特に好ましい。なお、前記において中枢組織とは、脳、延髄、脊髄、眼などからなる組織で詳しくは血液脳関門・血液網膜関門といった構造によって高分子量物質の輸送が制限されている領域であり、末梢組織とは身体

のそれ以外の領域を指す。一般に、神経線維は末梢組織の中では再生が可能であるが、中枢組織の中では再生することができない。

上記セマフォリンの有する成長円錐退縮（コラプス）活性とは、神経細胞（通常は

神経節の組織片)をインビトロで所定時間培養し、伸長した神経突起とその神経突起先端の成長円錐を観察しうる状態にした後、所定の濃度(例えば、約3ユニット/ml;なお、1ユニット/mlは50%の成長円錐を退縮させるセマフォリンの濃度をいう)のセマフォリンを加えさらに所定時間(例えば1時間)培養を続けた後に観察される成長円錐を消失させる活性をいう。伸長した神経突起とその神経突起先端の成長円錐を観察しうる状態とするために、神経細胞のインビトロでの培養は通常10時間から20時間行われるが、神経の種類、培養条件によって適宜変更することができる。そして、例えばこの実験系において、セマフォリンを添加する約1時間前にあらかじめ適当濃度の化合物を加えておいた場合に、セマフォリンによる成長円錐の退縮が抑制されたとき、かかる化合物をセマフォリン阻害剤、特にセマフォリンの成長円錐退縮活性の抑制作用を有する化合物とすることができる。また、かかる成長円錐退縮活性の抑制作用を有する化合物としては特に制限されるものではないが、100 μ g/ml以下、好ましくは30 μ g/ml以下、より好ましくは10 μ g/ml以下、最も好ましくは3 μ g/ml以下の濃度で前記抑制作用を示すものを例示することができる。さらに、セマフォリン阻害剤としては、神経細胞やセマフォリン発現細胞等の細胞の増殖に実質的に影響を与えることがない化合物が、本発明のセマフォリン阻害剤の効果を確認する上で、また、医薬品として用いた場合の安全性の点で好ましい。

また上記セマフォリンの有するコラーゲンゲル中での神経伸長阻害活性とは、例えばセマフォリン産生細胞と神経細胞(通常は神経節)とを共に含むコラーゲンゲル中で観察される神経伸長阻害活性をいう。そして当該神経伸長阻害活性の抑制作用とは、コラーゲンゲル中でのセマフォリン活性を持続的に阻害する活性であり、例えばコラーゲンゲル中で神経細胞と近接してセマフォリン産生細胞を培養し、通常一晚以上経過した後、神経突起伸長を観察したときに、セマフォリン産生細胞と逆側へ伸長している神経突起に比べてセマフォリン産生細胞の方へは1/3以下しか伸長しない実験条件において、その物質存在下で培養すると1/2以上の長さまで伸長すること

のできる活性をいう。また、かかるコラーゲンゲル中での神経伸長阻害活性の抑制作用を有する化合物としては特に制限されるものではないが、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下、好ましくは $30\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下、より好ましくは $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下、最も好ましくは $3\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の濃度で前記抑制作用を示すものを例示することができる。

5

上記セマフォリンの2種類の活性測定において用いられるセマフォリンとしては、天然型のセマフォリンに限定されることなく、前記の膜結合型のセマフォリンの細胞外ドメインのみを発現可溶化させたもの、抗体やアルカリホスファターゼなどの他のタンパク質との融合タンパク質、あるいはヒスタグや、フラグなどのタグを付けたもの、一部のアミノ酸を変化させたものなども使用することができる。また、培養に用いる神経細胞としては、ニワトリ7日齢、8日齢の胎仔から取り出した後根神経節が便利であるが、ニワトリ以外の動物の後根神経節、また、後根神経節以外の交感神経節、網膜神経節、上頸神経節など、インビトロ培養下において神経突起を伸長する神経細胞であればどのような神経細胞でも用いることができる。培養条件としては、神経突起の伸長を観察でき、セマフォリンの活性が測定できる条件であれば、特に制限

10

15

されるものではない。

本発明におけるセマフォリン阻害剤の作用機序は、以下のように考えられる。すなわち、セマフォリンの神経突起伸長抑制活性あるいは成長円錐退縮活性の発現は、まずセマフォリンが神経細胞表面（成長円錐）上のレセプターに結合することに始まる。セマフォリンの結合したレセプターから細胞内にシグナルが伝達され最終的にアクチン繊維の脱重合が惹起され、その結果として神経突起伸長抑制、成長円錐退縮が生じる。セマフォリン活性阻害はこれら一連の反応のいずれかの部分を阻害・遮断することで達成される。上記セマフォリンのレセプターとしては、前述のセマフォリンのいずれかのレセプターであればよく、セマフォリンが結合することができれば、その

20

25

改変体や、その一部のコンポーネントであってもよい。具体的には、ニューロピリン-1、プレキシシン（国際公開W001/405457）等が例示される。そして、本発明のセマ

フォリン阻害剤は、作用機序により限定されるものではなく、また上記の作用機序において、いずれの段階を阻害するものであっても本発明の範疇に含まれる。すなわち、上記セマフォリンのレセプター結合からアクチン繊維脱重合までに至る細胞内情報伝達に関わる反応を阻害することによりセマフォリン活性を阻害する化合物もまた、

5 本発明の範疇に含まれる。なお、セマフォリンのレセプター結合阻害活性を測定する方法としては、当業者により適宜選択される方法であればどのような方法であってもよく、例えば、前述の抗体やアルカリホスファターゼなどの他のタンパク質を融合したセマフォリン、あるいはヒスタグや、フラグなどのタグを付けたセマフォリンを、

10 被験物質存在下において当該セマフォリンレセプターあるいはレセプターコンポーネントを発現する細胞に対して結合させることで、セマフォリンのレセプター結合阻害活性を測定する方法を例示することができる。

前記一般式 (1) 及び (12) ~ (20) において、 R^1 は水素原子もしくはカルボキシル基を表し、好ましくはカルボキシル基を表す。また、 R^2 は水素原子もしくは水酸基を表し、好ましくは水酸基を表す。

15

前記一般式 (1)、(12) ~ (15)、及び (17) ~ (19) において、 R^5 は水素原子もしくはカルボキシル基を表し、好ましくはカルボキシル基を表す。また、 R^6 は水素原子もしくは水酸基を表し、好ましくは水酸基を表す。

前記一般式 (18) において、 R^8 は水素原子もしくは水酸基を表し、好ましくは水酸基を表す。

20

本発明のセマフォリン阻害剤を構成する化合物として、具体的には、後述する本件明細書実施例に記載された化合物を例示することができる。

前記一般式 (1)、及び (12) ~ (20) のいずれかで表される化合物、または

25 その薬学上許容される塩は、本発明者らが大阪府内土壌より分離したペニシリウム属に属するカビ、ペニシリウム・エスピー (Penicillium sp.) SPF-3059 株の培養物より、SPF-3059 株の培養物からセマフォリン阻害活性を指標と

する等して、得ることができる。

該SPF-3059株は次のような菌学的性質を有する。

(a) 培養的・形態的性質

麦芽エキス寒天培地上で、コロニーの生育は遅く、25℃、21日で直径2.

5. 8～2.9 cm、綿毛状を呈し、コロニー表面は白色又は黄色、コロニー裏面は濃い黄色であり、可溶性色素の産生及び孢子形成は認められない。ポテト・グルコース寒天培地上では、コロニーの生育は遅く、25℃、21日で直径3.2～3.3 cm、綿毛状を呈し、コロニー表面の色は白色又はクリーム色、コロニー裏面は濃い黄色又は黄褐色であり、可溶性色素の産生及び孢子形成は認められない。
10. ツアベック寒天培地上では、コロニーの生育は遅く、25℃、21日で直径3.1～3.2 cm、綿毛状を呈し、コロニー表面は白色又は灰色、コロニー裏面はクリーム色であり、可溶性色素の産生及び孢子形成は認められない。オートミール寒天培地（日本製薬製放線菌培地No.3「ダイゴ」）上では、コロニーの生育は遅く、25℃、21日で直径2.0～2.1 cm、綿毛状を呈し、コロニー
15. 表面は白色、灰緑色又は黄色、コロニー裏面はクリーム色又は灰色であり、可溶性色素の産生は認められないが、分生孢子を形成する。分生子柄は平滑、長さ5～20 μmであり、分生子柄の先端に3～6個のフィアライドを単輪生する。フィアライドは長さ3～4 μmであり、その先端から分生子が2～10個の連鎖を形成する。分生子は球形で、直径2.2～2.4 μm、表面には縦に通常10本の
20. のしわがある。テレオモルフは認められない。

(b) 生理学的性質

①生育pH範囲

サブローブロス中、27℃、3日間の振盪培養における生育は次の通り。

25	pH	生育
	3.1	—
	4.5	+

	5. 5	++
	7. 1	+++
	8. 0	++
	9. 0	±
5	10. 0	—

②生育温度範囲

オートミール寒天培地上、38℃、5日間の培養で生育が認められる。

- 以上の菌学的性質より、本菌株をペニシリウム属に属する菌株であると同定し、ペニシリウム・エスピー (Penicillium sp.) S P F-3059と命名した。本
- 10 菌株は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約に基づき、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号 F E R M B P-7663として寄託されている。

- 上記 S P F-3059株の培養に使用される培地は液状でも固体でもよいが、
- 15 通常は液体培地による振盪培養又は通気攪拌培養が有利である。使用する培地は、特に限定されるものではないが、炭素源としては、例えばグルコース、ショ糖、グリセリン、デンプン、デキストリン、糖蜜等が用いられ、また窒素源としては、例えばペプトン、カザミノ酸等の蛋白質加水分解物、肉エキス、酵母エキス、大豆粉、綿実粉、コーンステープリカー、ヒスチジン等のアミノ酸類等の有
- 20 機窒素源や、アンモニウム塩や硝酸塩等の無機窒素源が用いられる。その他、浸透圧調整、pH調整、微量成分の補給等のために、各種リン酸塩、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、炭酸カルシウム等の無機塩類を添加することも可能である。さらに菌の生育を促進する目的で、各種ビタミン類、核酸関連化合物等を添加しても良い。なお、培養期間中に、シリコン油、ポリプロピレ
- 25 ングリコール誘導体、大豆油等の消泡剤を添加することも可能である。そして、培養温度としては、好ましくは20～35℃の範囲、より好ましくは25～30℃の範囲の温度を挙げることができ、培地のpHとして例えば、中性付近の範囲

を挙げることができ、培養期間としては例えば、5～10日間の範囲を例示することができる。

本発明の一般式(1)及び(12)～(20)のいずれかで表される化合物を
5 培養液から単離・精製するには、微生物の生産する二次代謝物の培養物から、通常使用される単離・精製手段を用いることができる。培養液上清から目的物を単離・精製する場合は、培養濾液からの通常の単離・精製法、例えば溶媒抽出、イオン交換樹脂、吸着クロマトグラフィー、分配クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、薄層クロマトグラフィー等を用いることができ、これらの単離・精製法は単独又は組み合わせて
10 行うことができる。また、培養菌体から目的物を単離・精製する場合は、濾過又は遠心分離等の手段で集めた菌体を、アセトン、メタノール等の水溶性有機溶媒を用いて直接抽出することができ、抽出物は培養液上清からの単離・精製と同様の方法で、目的化合物を得ることができる。該目的化合物は、水、メタノール、
15 エタノール、アセトン、酢酸エチル、クロロホルム、エーテル等の適当な溶媒を用いて、約1当量の塩基を作用させることによって、塩とすることもできる。

また、本発明のセマフォリン阻害剤を構成する化合物においては、それらの塩、好ましくは医薬的又は獣医薬的に許容される塩も本発明の範疇に含まれる。ここで、
20 塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、アルミニウム塩、アンモニウム塩等の無機塩基塩や、トリエチルアンモニウム塩、トリエタノールアンモニウム塩、ピリジニウム塩、ジイソプロピルアンモニウム塩等の有機塩基塩や、アルギニン、リジン等の塩基性アミノ酸塩などを挙げることができる。

25 本発明の脊髄神経の損傷及び／又は末梢神経の損傷を伴う疾患を含む神経障害疾患及び／又は神経変性疾患の予防若しくは治療剤は、神経伸長反発因子阻害剤、特に上記セマフォリン阻害剤を有効成分とする前記の神経再生促進剤を含有するものであ

れば特に制限されるものではないが、薬学的に許容される通常の担体、結合剤、安定化剤、賦形剤、希釈剤、pH緩衝剤、崩壊剤、可溶化剤、溶解補助剤、等張剤などの各種調剤用配合成分を添加することができる。またこれら予防若しくは治療剤は、経口的又は非経口的に投与することができる。すなわち通常用いられる投与形態、例えば粉末、顆粒、カプセル剤、シロップ剤、懸濁液等の剤型で経口的に投与することができ、あるいは、例えば溶液、乳剤、懸濁液等の剤型にしたものを注射の型で非経口投与することができる他、スプレー剤の型で鼻孔内投与することもできる。

10 投与量及び投与回数は、投与方法と患者の年齢、体重、病状等によって異なるが、病床部位に局所的に投与する方法が好ましい。神経の再生には通常数日から数ヶ月以上の期間を要するので、その間セマフォリンの活性を抑制するために1回又は2回以上投与することが好ましい。2回以上投与するときは連日あるいは適当な間隔をおいて繰り返し投与することが望ましい。投与量は一回当たりセマフォリン阻害剤として数百 μ g～2g、好ましくは数十mg以下を用いることができ、投与回数を減らすために徐放性製剤を用いたり、オスモティックポンプなどで長期間にわたって少量ずつ投与することもできる。そして、これらのいずれの投与方法においても、作用部位においてセマフォリンの活性を十分に阻害する濃度になるような投与経路、投与方法を採用することが好ましい。

20

上記脊髄神経の損傷及び／又は末梢神経の損傷を伴う疾患を含む神経障害疾患及び／又は神経変性疾患としては、末梢神経や中枢神経の傷害、変性疾患、すなわち老化等に起因する嗅覚異常症、脊髄損傷などの外傷による嗅覚以外の神経傷害、脳梗塞などに起因する神経障害、顔面神経麻痺、糖尿病性神経症、緑内障、網膜色素変性症、
25 、アルツハイマー病やパーキンソン病、ALSといった神経変性疾患、筋發育不全性側索硬化症、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病、脳梗塞、外傷性神経変性疾患などを具体的に挙げるることができる。さらに、受容体がニューロピリンである点

が共通である VEGF 165 が関与する血管新生を伴う疾患も、対象となる。

また、本発明の神経再生促進剤の用途は、神経障害疾患及び／又は神経変性疾患の予防若しくは治療剤等の医薬品に限定されることなく、動物薬、さらにはセマフォリンシグナル阻害剤として産業上重要な実験試薬としても利用が可能である。本発明の神経再生促進剤はセマフォリン阻害剤を有効成分として含むことから、末梢神経である嗅神経の再生や、脳や脊髄の中の嗅球、大脳皮質、海馬、線条体、視床、間脳、中脳、小脳、橋、延髄、脊髄、網膜などにあつて脳脊髄関門で区切られた領域である中枢内での神経の再生を促進する。

実施例

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例 1 (本発明の化合物の製造)

グルコース 2 %、ショ糖 5 %、綿実粉 2 %、硝酸ナトリウム 0.1 %、L-ヒスチジン 0.1 %、リン酸 2 カリウム 0.05 %、塩化カリウム 0.07 %、硫酸マグネシウム 7 水和物 0.0014 % を含み、pH 7.0 に調整した培地 10 ml を 50 ml 容の三角フラスコに分注しオートクレーブで滅菌した。これに斜面培養したペニシリウム・エスピー SPF-3059 株 (FERM BP-7663) を 1 白金耳接種し、27℃、180 rpm にて 4 日間回転振盪培養して前々培養とした。500 ml 容三角フラスコ 5 本に上記と同じ組成の培地を 125 ml ずつ分注しオートクレーブで滅菌した後、上記の前々培養液を 4 ml ずつ添加し、27℃、180 rpm にて 4 日間回転振盪培養して前培養とした。50リットル容ジャーファーマンターに、グルコース 1.43 %、ショ糖 3.57 %、綿実粉 1.43 %、硝酸ナトリウム 0.07 %、L-ヒスチジン 0.07 %、リン酸 2 カリウム 0.036 %、塩化カリウム 0.05 %、硫酸マグネシウム 7 水

和物 0.001%、アデカノールLG-295S（旭電化製消泡剤）0.01%
を含み、pH 7.0に調整した培地を30リットル分注し、高圧蒸気滅菌（121℃、20分）した後、上記の前培養液を500ml添加し、27℃、400rpm、通気量15リットル／分にて9日間通気攪拌培養した。

5

培養終了後、培養液を10,000rpmにて10分間遠心分離して上清液と菌体に分離した。菌体画分を30リットルのアセトンで抽出し、濾過、濃縮後、水溶液となったところで10リットルの酢酸エチル-蟻酸（99：1）で2回抽出した。抽出液を減圧濃縮して粗抽出物130gを得た。これを200mlのメ
10 タノールに溶解し、Sephadex（登録商標）LH-20（アマシャムファルマシアバイオテク社）を用いるカラムクロマトグラフィーに付し、メタノールで溶出した。活性画分を集め、溶媒を減圧留去し、油状物91.4gを得た。こ
15 れを200mlのメタノールに溶解し、TOYOPEARL（登録商標）HW-40F（東ソー）を用いるカラムクロマトグラフィーに付し、メタノールで溶
20 出した。活性画分を集め、溶媒を減圧留去し、粗精製物41.9gを得た。これ
を500mgずつ2.5mlのジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解し、分
取逆相HPLCに付した。分取逆相HPLCの条件は、カラム：Wakopak
（登録商標）Wakosil-II5C18HGprep（φ5×10cmとφ5×25cmを連結、和光純薬工業製）、溶出液A：1%蟻酸水溶液、溶出液B：メ
タノール、グラジエント：B液割合45%から75%へ2時間の直線的グラジエ
ント、流速：25ml／分、検出：260nmにおける吸光度、とし、溶出液を1
分ずつ分取した。

上記分取した画分を分析用HPLCで分析した。分析用HPLCの条件は、カ
25 ラム：Wakopak Wakosil-II5C18RS（φ4.6×150mm、和光純薬工業製）、溶出液A：1%蟻酸水溶液、溶出液B：メタノール、グラ
ジエント：B液割合20%から67%へ71.1分間の直線的グラジエント、流

速：1. 3ml/分、検出：260nmにおける吸光度、とした。この分析用HPLCにおける保持時間を指標に分取用HPLCの溶出画分を集め、減圧下に溶媒を留去した後、再度分取用HPLCに付して上記と同様に精製し、さらにTOYOPEARL（登録商標）HW-40F（東ソー）を用いるカラムクロマト
 5 グラフィーに付して上記と同様に精製し、溶媒を減圧留去、乾燥することにより、以下に示す精製品を得た。

表1

10	化合物	取得量 (mg)	分析用HPLCでの保持時間 (分)
	SPF-3059-8	11.1	51.2
	SPF-3059-10	3.3	54.8
	SPF-3059-16	6.7	41.5
15	SPF-3059-17	7.9	57.0
	SPF-3059-18	1.6	51.5
	SPF-3059-19	7.8	39.6
	SPF-3059-20	1.3	45.5
	SPF-3059-22	1.0	48.4
20	SPF-3059-23	16.7	33.2
	SPF-3059-31	6.5	49.6
	SPF-3059-38	4.0	63.1
	SPF-3059-40	2.3	53.7
	SPF-3059-41	1.0	54.0
25	SPF-3059-42	2.4	48.2

得られた化合物の物理化学的性状は次の通り。

(SPF-3059-8)

外観：クリーム色粉末

5 分子量：578

分子式： $C_{28}H_{18}O_{14}$

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (positive) : 579 (M+H)⁺

10 高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (negative) : 576 (M-H)⁻

高分解能高速電子衝撃質量スペクトル (HRFAB-MS) m/z (M+H)⁺ :

実測値：579.0779

計算値：579.0775 ($C_{28}H_{19}O_{14}$)

15 紫外可視吸収スペクトル λ_{max} (メタノール中) nm (ϵ) :

220(45700)、305(18200)、358(16800)

赤外吸収スペクトル ν_{max} (KBr) cm^{-1} :

3414、1652、1568、1464、1614、1289

1H -NMR (DMSO- d_6) δ ppm :

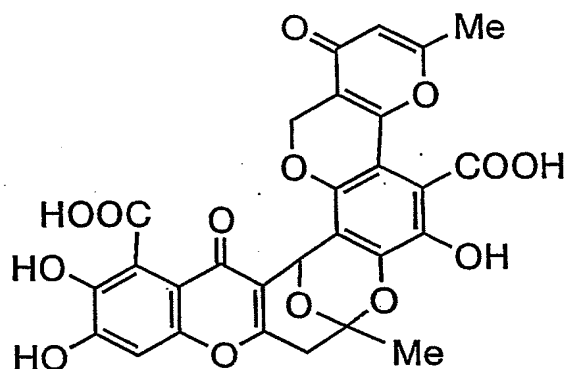
20 1.75(3H, s)、2.21(3H, s)、3.06(1H, d, 18.8)、3.41(1H, d, 18.8)、4.72(1H, d, 13.6)、5.02(1H, d, 13.6)、6.16(1H, s)、6.17(1H, s)、6.84(1H, s)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ ppm :

25 18.7、26.9、38.2、62.0、62.1、101.1、102.1、104.8、112.3、112.6、113.3、113.5、116.6、119.1、119.4、141.4、143.7(2C)、145.0、149.9、152.0、154.7、159.4、164.6、167.3、167.7、170.9、174.8

溶解性：水、ヘキサンに不溶、メタノール、DMSOに可溶

これらからSPF-3059-8の構造式を、次式と決定した。



(SPF-3059-10)

外観：黄色粉末

5 物質の性質：酸性物質

分子量：544

分子式： $C_{28}H_{16}O_{12}$

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (positive) : 545 (M+H)⁺

10 高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (negative) : 543 (M-H)⁻

高分解能高速電子衝撃質量スペクトル (HRFAB-MS) m/z (M+H)⁺ :

実測値：545.0732

15 計算値：545.0740 ($C_{28}H_{17}O_{12}$)

紫外可視吸収スペクトル λ_{max} (メタノール中) nm (ϵ) :

213(41700)、286(29500)、338sh(14900)、429sh(6500)

赤外吸収スペクトル ν_{max} (KBr) cm^{-1} :

3358、3073、1700、1674、1631、1464、1276、1248

20 ¹H-NMRスペクトル：

重ジメチルスルフォキシド (DMSO- d_6) 中、500MHzで測定したスペクトルを図1に示す。

^{13}C -NMRスペクトル:

重ジメチルスルフォキシド ($\text{DMSO}-d_6$) 中、125MHzで測定したスペクトルを図2に示す。

溶解性: 水、ヘキサンに不溶、メタノール、DMSOに可溶

5

(SPF-3059-16)

外観: クリーム色粉末

分子量: 580

分子式: $\text{C}_{28}\text{H}_{20}\text{O}_{14}$

10 高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (positive): 581 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (negative): 79 ($\text{M}-\text{H}$)⁻

高分解能高速電子衝撃質量スペクトル (HRFAB-MS) m/z ($\text{M}-\text{H}$)⁻

15 :

実測値: 579.0812

計算値: 579.0776 ($\text{C}_{28}\text{H}_{19}\text{O}_{14}$)

紫外可視吸収スペクトル λ_{max} (メタノール中) nm (ϵ):

210(44500)、323(15000)、353sh(12000)

20 赤外吸収スペクトル ν_{max} (KBr) cm^{-1} :

3420、1694、1668、1634、1568、1464、1278

^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ ppm:

1.88(3H, s)、2.08(3H, s)、2.28(1H, d, 16.6)、2.34(1H, d, 16.6)、4.07(1H, d, 10.1)、4.17(1H, s)、4.42(1H, d, 10.1)、6.29(1H, s)、6.93(1H, s)

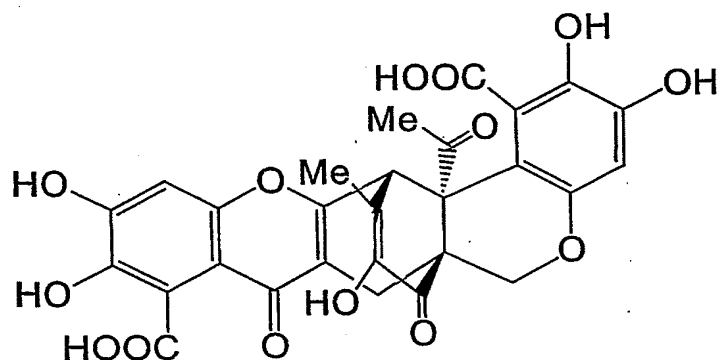
25 ^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ ppm:

21.1、24.2、30.4、50.1、50.4、64.9、69.3、102.3、104.1、110.6、111.6、112、119.0、121.6、138.7、139.4、141.6、147.1、148.0、150.4、152.1、160.4、162.

6、167.7、171.3、174.3、198.6、201.3

溶解性：水、ヘキサンに不溶、メタノール、DMSOに可溶

これらからSPF-3059-16の構造式を、次式と決定した（立体は相対立体配置）。



(SPF-3059-17)

外観：黄色粉末

分子量：578

10 分子式：C₂₈H₁₈O₁₄

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (positive) : 579 (M+H)⁺

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (negative) : 577 (M-H)⁻

15 高分解能高速電子衝撃質量スペクトル (HRFAB-MS) m/z (M-H)⁻ :

実測値：577.0675

計算値：577.0619 (C₂₈H₁₇O₁₄)

紫外可視吸収スペクトル λ_{max} (メタノール中) nm (ε) :

20 214(49400)、301(8900)、390(22100)

赤外吸収スペクトル ν_{max} (KBr) cm⁻¹ :

3109、1656、1564、1459、1272

^1H -NMR (DMSO- d_6) δ ppm:

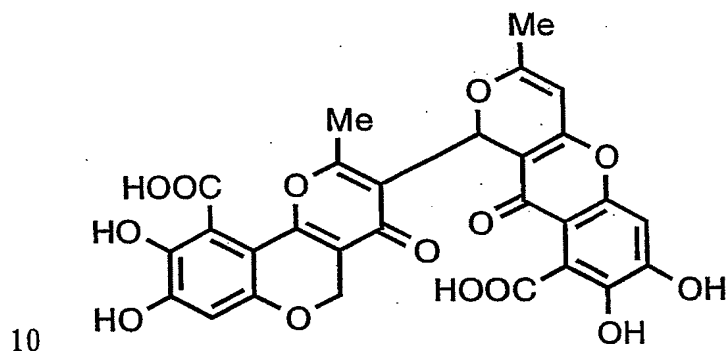
1.89 (3H, s)、2.46 (3H, s)、4.85 (1H, d, 13.3)、4.92 (1H, d, 13.3)、5.52 (1H, s)、
6.42 (1H, s)、6.65 (1H, s)、6.88 (1H, s)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ ppm:

5 17.1、20.2、61.9、71.9、91.8、102.8、103.0 (2C)、103.5、111.0、112.6、117.6、119.2、122.9、139.4、143.3、149.2、150.4、151.2、151.7、154.4、159.1、163.4、165.6、167.8、168.6、170.9、172.9

溶解性: 水、ヘキサンに不溶、メタノール、DMSOに可溶

これらから SPF-3059-17 の構造式を、次式と決定した。



(SPF-3059-18)

外観: オレンジ色粉末

物質の性質: 酸性物質

15 分子量: 560

分子式: $\text{C}_{28}\text{H}_{16}\text{O}_{13}$

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (positive): 561 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (negative): 559 ($\text{M}-\text{H}$)⁻

20 高分解能高速電子衝撃質量スペクトル (HRFAB-MS) m/z ($\text{M}+\text{H}$)⁺
:

実測値 : 561.0710

計算値 : 561.0670 ($C_{28}H_{17}O_{13}$)

紫外可視吸収スペクトル λ_{max} (メタノール中) nm (ϵ) :

219(34300)、257(28900)、311(28600)、404(14600)、450(14400)

5 赤外吸収スペクトル ν_{max} (KBr) cm^{-1} :

3154、1657、1605、1468、1279

1H -NMRスペクトル :

重ジメチルスルフォキシド ($DMSO-d_6$) 中、500MHzで測定したスペクトルを図3に示す。

10 ^{13}C -NMRスペクトル :

重ジメチルスルフォキシド ($DMSO-d_6$) 中、125MHzで測定したスペクトルを図4に示す。

溶解性 : 水、ヘキサンに不溶、メタノール、DMSOに可溶

15 (SPF-3059-19)

外観 : 黄色粉末

分子量 : 596

分子式 : $C_{28}H_{20}O_{15}$

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (positive) : 5

20 97 ($M+H$)⁺

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (negative) : 5

95 ($M-H$)⁻

高分解能高速電子衝撃質量スペクトル (HRFAB-MS) m/z ($M+H$)⁺

:

25 実測値 : 597.0890

計算値 : 597.0881 ($C_{28}H_{21}O_{15}$)

紫外可視吸収スペクトル λ_{max} (メタノール中) nm (ϵ) :

204(34600)、225(30900)、267sh(8300)、319(17100)、349(13800)、404(10100)

赤外吸収スペクトル ν_{\max} (KBr) cm^{-1} :

3418、1634、1605、1462、1270

5 ^1H -NMR (DMSO- d_6) δ ppm :

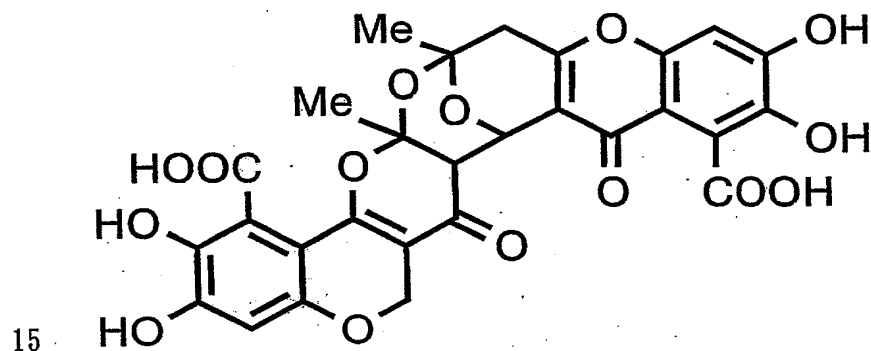
1.43(3H, s)、1.55(3H, s)、2.94(1H, d, 5.5)、3.17(1H, d, 18.6)、3.24(1H, d, 18.6)、4.38(1H, d, 11.9)、4.54(1H, d, 11.9)、5.27(1H, d, 5.5)、5.84(1H, s)、6.59(1H, s)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ ppm :

10 24.5、28.7、36.6、49.4、62.1、64.2、96.8、99.6、102.0、102.6、103.0、104.0、111.1、120.2(2C)、113.1、137.3、146.5、150.8、151.8、152.0、153.0、159.2、161.3、167.7、169.8、172.6、185.4

溶解性：水、ヘキサンに不溶、メタノール、DMSOに可溶

これらから SPF-3059-19 の構造式を、次式と決定した。



(SPF-3059-20)

外観：黄色粉末

分子量：562

20 分子式： $\text{C}_{28}\text{H}_{18}\text{O}_{13}$

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (positive) : 5

63 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (negative) : 561 (M-H)⁻

高分解能高速電子衝撃質量スペクトル (HRFAB-MS) m/z (M+H)⁺ :

5 実測値 : 563.0882

計算値 : 563.0826 (C₂₈H₁₉O₁₃)

紫外可視吸収スペクトル λ_{max} (メタノール中) nm (ϵ) :

216(49100)、301(21700)、369(14200)

赤外吸収スペクトル ν_{max} (KBr) cm⁻¹ :

10 3444、3069、1690、1649、1619、1536、1435、1283

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm :

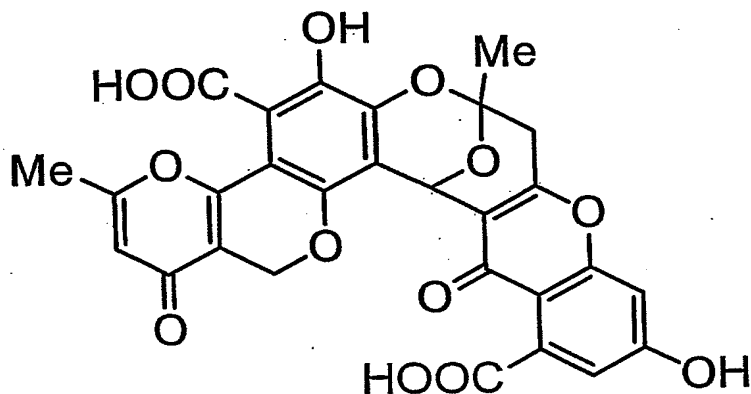
1.76(3H, s), 2.21(3H, s), 3.09(1H, d, 18.8), 3.43(1H, d, 18.8), 4.75(1H, d, 13.4), 5.03(1H, d, 13.4), 6.17(1H, s), 6.18(1H, s), 6.75(1H, d, 2.1), 6.83(1H, d, 2.1)

¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ ppm :

15 18.7, 27.0, 38.3, 61.8, 62.2, 101.0, 102.9, 104.8, 112.3, 112.7, 113.1, 113.3, 113.4, 117.4, 119.2, 136.3, 141.1, 143.7, 145.1, 154.7, 156.9, 160.2, 161.9, 164.7, 167.3, 169.3, 170.8, 174.9

溶解性 : 水、ヘキサンに不溶、メタノール、DMSOに可溶

これらから SPF-3059-20 の構造式を、次式と決定した。



(SPF-3059-22)

外観：クリーム色粉末

分子量：548

分子式： $C_{27}H_{16}O_{13}$

5 高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (positive) : 549 ($M+H$)⁺

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (negative) : 547 ($M-H$)⁻

10 高分解能高速電子衝撃質量スペクトル (HRFAB-MS) m/z ($M-H$)⁻ :

実測値：547.0568

計算値：547.0513 ($C_{27}H_{15}O_{13}$)

紫外可視吸収スペクトル λ_{max} (メタノール中) nm (ϵ) :

208(51900)、240sh(43900)、270sh(38000)、310(30700)、387(18000)

15 赤外吸収スペクトル ν_{max} (KBr) cm^{-1} :

3410、3068、1655、1619、1599、1561、1460、1310、1251

¹H-NMR (DMSO- d_6) δ ppm :

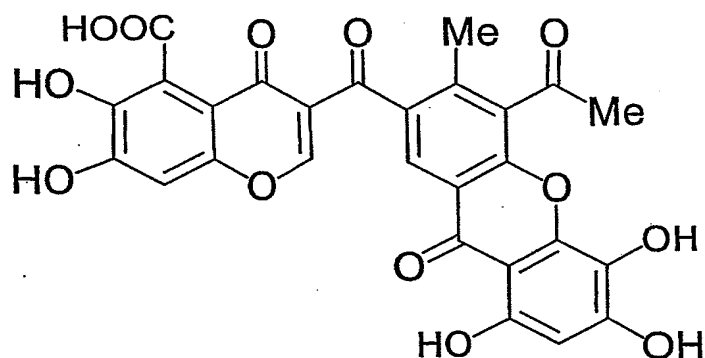
2.34(3H, s)、2.73(3H, s)、6.31(1H, s)、6.98(1H, s)、8.08(1H, s)、8.69(1H, s)

20 ¹³C-NMR (DMSO- d_6) δ ppm :

17.1、32.3、98.1、101.8、102.6、113.3、117.1、119.8、123.2、125.4、126、131.9、136.2、140.4、142.1、144.7、150.4、152.7、152.9、154.8、156.2、160.4、167.1、172.1、178.9、192.7、202.4

溶解性：水、ヘキサンに不溶、メタノール、DMSOに可溶

25 これらからSPF-3059-22の構造式を、次式と決定した。



(SPF-3059-23)

外観：黄色粉末

5 分子量：686

分子式： $C_{34}H_{22}O_{16}$

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (positive) : 687 (M+H)⁺

10 高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (negative) : 685 (M-H)⁻

高分解能高速電子衝撃質量スペクトル (HRFAB-MS) m/z (M-H)⁻ :

実測値：685.0887

計算値：685.0830 ($C_{34}H_{21}O_{16}$)

15 紫外可視吸収スペクトル λ_{max} (メタノール中) nm (ϵ) :

213(53800)、282sh(24100)、324(21700)

赤外吸収スペクトル ν_{max} (KBr) cm^{-1} :

3354、1688、1588、1468、1288

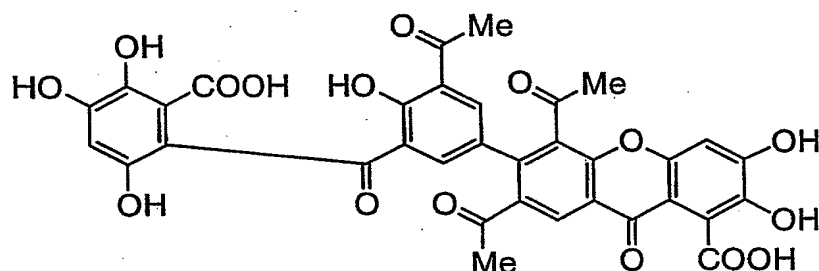
¹H-NMR (DMSO- d_6) δ ppm :

20 2.14(3H, s), 2.21(3H, s), 2.61(3H, brs), 6.50(1H, s), 6.85(1H, s), 7.28(1H, brs), 7.68(1H, brs), 8.29(1H, s)

¹³C-NMR (DMSO- d_6) δ ppm :

30.2, 31.3, 32.3, 102.4, 107.3, 110.0, 114.7, 114.9, 119.7, 120.5, 123.8,
125.9, 126.4, 126.5, 132.6, 135.6, 136.1, 136.7, 139.5, 141.0, 143.4, 145.6,
147.8, 150.4, 151.8, 154.1, 160.5, 167.5, 170.5, 172.7, 197.9, 200.4, 201.2,
202.0

- 5 溶解性：水、ヘキサンに不溶、メタノール、DMSOに可溶
これらからSPF-3059-23の構造式を、次式と決定した。



(SPF-3059-31)

- 10 外観：黄色粉末

物質の性質：酸性物質

分子量：668

分子式： $C_{34}H_{20}O_{15}$

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (positive) : 6

- 15 69 ($M+H$)⁺

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (negative) : 6

67 ($M-H$)⁻

高分解能高速電子衝撃質量スペクトル (HRFAB-MS) m/z ($M+H$)⁺

:

- 20 実測値：669.0887

計算値：669.0881 ($C_{34}H_{21}O_{15}$)

紫外可視吸収スペクトル λ_{max} (メタノール中) nm (ϵ) :

213(54600)、235sh(39400)、312(31300)、350(24200)

赤外吸収スペクトル ν_{\max} (KBr) cm^{-1} :

3348、1766、1707、1644、1588、1464、1301

^1H -NMRスペクトル:

重ジメチルスルフォキシド ($\text{DMSO}-d_6$) 中、500 MHz で測定したスペクトルを図5に示す。

^{13}C -NMRスペクトル:

重ジメチルスルフォキシド ($\text{DMSO}-d_6$) 中、125 MHz で測定したスペクトルを図6に示す。

溶解性: 水、ヘキサンに不溶、メタノール、DMSOに可溶

10

(SPF-3059-38)

外観: 黄色粉末

分子量: 654

分子式: $\text{C}_{34}\text{H}_{22}\text{O}_{14}$

15 高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (positive) : 655 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (negative) : 653 ($\text{M}-\text{H}$)⁻

高分解能高速電子衝撃質量スペクトル (HRFAB-MS) m/z ($\text{M}+\text{H}$)⁺

20 :

実測値: 655.1100

計算値: 655.1088 ($\text{C}_{34}\text{H}_{23}\text{O}_{14}$)

紫外可視吸収スペクトル λ_{\max} (メタノール中) nm (ϵ) :

212(41100)、239sh(34000)、287(22200)、300sh(21900)、328(24400)

25 赤外吸収スペクトル ν_{\max} (KBr) cm^{-1} :

3418、1696、1660、1607、1471、1283

^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ ppm :

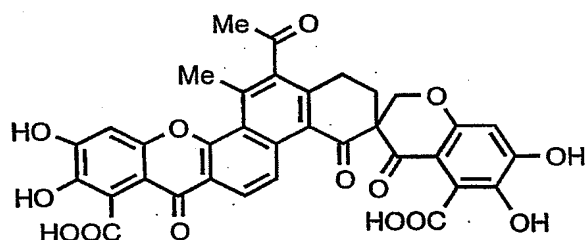
2.30 (1H, m)、2.36 (1H, m)、2.65 (3H, s)、2.81 (1H, m)、2.96 (1H, m)、3.00 (3H, s)、4.56 (1H, d, 11.8)、4.75 (1H, d, 11.8)、6.43 (1H, s)、7.07 (1H, s)、8.15 (1H, d, 9.2)、8.73 (1H, d, 9.2)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ ppm:

5 21.7、23.3、26.6、32.9、56.9、71.3、102.3、102.5、107.9、110.2、117.4、119.4、121.2、122.22、122.24、124.0、127.1、134.3、136.1、138.1、141.7、141.8、142.1、150.1、154.0、154.1、154.6、155.6、167.7、167.9、173.1、189.5、197.5、207.2

溶解性：水、ヘキサンに不溶、メタノール、DMSOに可溶

10 これらから SPF-3059-38 の構造式を、次式と決定した。



(SPF-3059-40)

外観：オレンジ色粉末

15 分子量：536

分子式： $\text{C}_{27}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (positive) : 537 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (negative) : 535 ($\text{M}-\text{H}$)⁻

20

高分解能高速電子衝撃質量スペクトル (HRFAB-MS) m/z ($\text{M}+\text{H}$)⁺

:

実測値：537.1018

計算値：537.1034 ($\text{C}_{27}\text{H}_{21}\text{O}_{12}$)

紫外可視吸収スペクトル λ_{\max} (メタノール中) nm (ϵ) :

209(34100)、223(34200)、277(19900)、340(11600)、460(25000)

赤外吸収スペクトル ν_{\max} (KBr) cm^{-1} :

3361、1698、1620、1465、1293

5

^1H -NMR (DMSO- d_6) δ ppm :

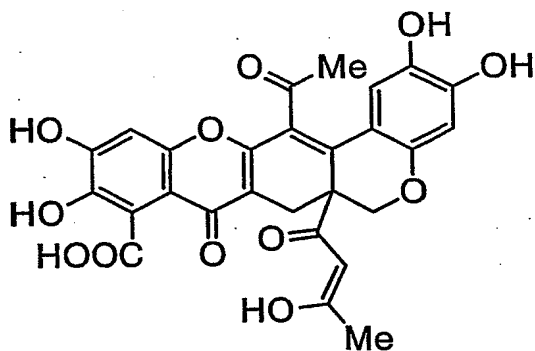
1.95(3H, s), 2.34(1H, d, 16.8), 2.63(3H, s), 3.22(1H, d, 16.8), 4.04(1H, d, 10.8), 4.51(1H, d, 10.8), 5.78(1H, s), 6.27(1H, s), 6.76(1H, s), 6.78(1H, s)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ ppm :

23.7, 24.4, 32.0, 50.6, 71.9, 98.4, 102.5, 104.5, 109.0, 109.3, 111.9, 112.7, 118.8, 125.0, 135.4, 141.2, 143.0, 149.7, 151.1, 152.0, 152.6, 155.8, 168.3, 172.5, 189.0, 197.0, 204.2

溶解性 : 水、ヘキサンに不溶、メタノール、DMSOに可溶

これらからSPF-3059-40の構造式を、次式と決定した。



15

(SPF-3059-41)

外観 : 黄色粉末

物質の性質 : 酸性物質

20

分子量 : 548

分子式 : $\text{C}_{28}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (positive) : 5

49 (M+H)⁺

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (negative) : 5

47 (M-H)⁻

高分解能高速電子衝撃質量スペクトル (HRFAB-MS) m/z (M+H)⁺

5 :

実測値 : 549.1002

計算値 : 549.1034 (C₂₈H₂₁O₁₂)

紫外可視吸収スペクトル λ_{max} (メタノール中) nm (ε) :

227(30200)、282sh(13500)、315(13900)、356(11000)

10 赤外吸収スペクトル ν_{max} (KBr) cm⁻¹ :

3396、1688、1662、1622、1470、1294

¹H-NMRスペクトル :

重ジメチルスルフォキシド (DMSO-d₆) 中、500MHzで測定したスペクトルを図7に示す。

15 ¹³C-NMRスペクトル :

重ジメチルスルフォキシド (DMSO-d₆) 中、125MHzで測定したスペクトルを図8に示す。

溶解性 : 水、ヘキサンに不溶、メタノール、DMSOに可溶

20 (SPF-3059-42)

外観 : 黄色粉末

分子量 : 806

分子式 : C₄₁H₂₆O₁₈

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (positive) : 8

25 07 (M+H)⁺

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (negative) : 8

05 (M-H)⁻

高分解能マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量スペクトル (HR MALDI-TOF-MS) m/z ($M+H$)⁺:

実測値: 807.1261

計算値: 807.1198 ($C_{41}H_{27}O_{18}$)

5 紫外可視吸収スペクトル λ_{max} (メタノール中) nm (ϵ):

221(58300)、316(28000)、353(23100)

赤外吸収スペクトル ν_{max} (KBr) cm^{-1} :

3400、1704、1651、1620、1444、1294

1H -NMR ($DMSO-d_6$) δ ppm:

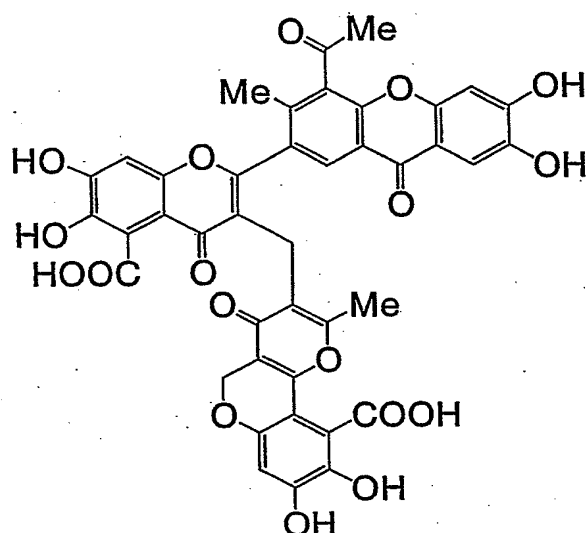
10 2.08(3H, s)、2.10(3H, s)、2.51(3H, s)、3.47(1H, d, 15.9)、3.54(1H, d, 15.9)、
4.48(1H, d, 13.1)、4.65(1H, d, 13.1)、6.28(1H, s)、6.84(1H, s)、6.89(1H, s)、
7.40(1H, s)、8.12(1H, s)

^{13}C -NMR ($DMSO-d_6$) δ ppm:

15 16.5、17.1、19.1、31.9、61.8、102.1、102.9(2C)、103.4、108.7、109.2、11
1.5、113.5、118.5、119.1(2C)、119.7、122.0、127.8、128.9、131.2、139.1(2C)、
141.7、144.2、150.0、154.0(2C)、150.5、150.6、150.7、152.0、152.3、158.9
、160.9、167.8、167.9、173.1、173.3、175.0、202.5

溶解性: 水、ヘキサンに不溶、メタノール、DMSOに可溶。

これらから SPF-3059-42 の構造式を、次式と決定した。



実施例 2 (Sema 3 Aのコラプス活性に対する本発明の化合物の抑制作用)

ポリリジンを塗布した96ウェルプレート(住友ベークライト)にさらにラミニン
 5 塗布(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のラミニン、室温1時間)を行った。各ウェルに100 μl の
 培地(10%の牛胎仔血清、20 ng/ml のNGF、100ユニット/ ml のペニ
 シリン、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のストレプトマイシンを含むF12培地)を入れ、ここに
 7日齢ニワトリ胚から摘出した後根神経節を接種し、16~20時間5% CO_2 、3
 7℃の条件下で培養した。その後、対象化合物を種々の濃度で培地に添加し1時間培
 10 養後、3ユニット/ ml のマウスセマフォリン3A(Sema 3 A)を添加し、更に
 1時間培養した。1時間経過後、速やかに最終濃度1%になるようにグルタルアルデ
 ヒドを添加し、室温に15分間放置して組織片を固定した後、顕微鏡下で退縮した成
 長円錐の割合を測定した。陰性対照群(化合物、Sema 3 A共に不添加)の成長円錐退
 縮割合を(A) %、陽性対照群(化合物不添加、Sema 3 A添加)の成長円錐退
 15 縮割合を(B) %、試験群(各化合物及びSema 3 A添加)の成長円錐退縮割合を(C)
 %として、 $C = (A + B) / 2$ となる各化合物の濃度をIC50値とした。結果を
 以下に示す。この結果から、本発明の化合物は強くセマフォリンを阻害することが
 わかる。

表 2

	化合物	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
5	SPF-3059-8	2
	SPF-3059-10	2
	SPF-3059-16	0.5
	SPF-3059-17	0.13
	SPF-3059-18	0.063
10	SPF-3059-19	0.5
	SPF-3059-20	4
	SPF-3059-22	0.5
	SPF-3059-23	0.5
	SPF-3059-31	0.25
15	SPF-3059-38	0.013
	SPF-3059-40	0.125
	SPF-3059-41	0.25
	SPF-3059-42	0.063

20

実施例 3 (本発明の化合物の塩の製造)

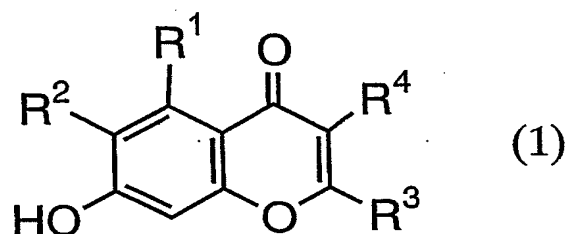
本発明の化合物をメタノールに溶解して1mM溶液を調製する。この溶液1m
 1に、1mM水酸化ナトリウムのメタノール溶液を、本発明の化合物が2個のカ
 ルボキシル基を持つ場合は2m1、本発明の化合物が1個のカ
 ルボキシル基を持
 25 2つ場合は1m1加え、十分に混合する。この溶液を減圧下に溶媒を留去、乾燥し
 、本発明の化合物のナトリウム塩1 μmol を得る。

産業上の利用可能性

本発明の化合物は、セマフォリン阻害活性を有し、各種神経障害性疾患・神経変性疾患に対する予防剤や治療剤として有利に用いることができる。

請求の範囲

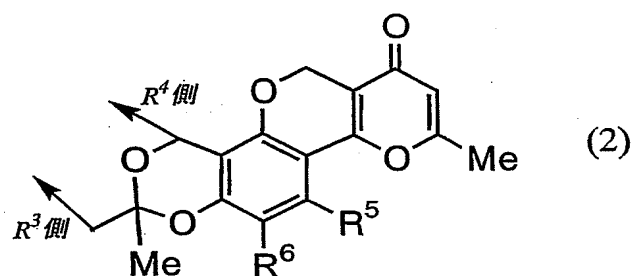
1. 一般式(1)で表される化合物、またはその薬学上許容される塩。



[式中、 R^1 は水素原子またはカルボキシル基を表し、 R^2 は水素原子または水酸基を

5. 表し、 R^3 および R^4 は以下の [I] ~ [IX] のいずれかを表す。

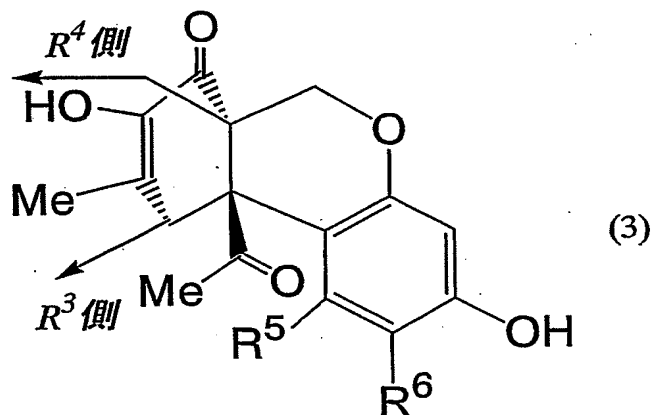
[I] R^3 および R^4 は結合して、式(2)：



(式中、 R^5 は水素原子またはカルボキシル基を表し、 R^6 は水素原子または水酸基を表す。)

10. で表される2価基を表す。

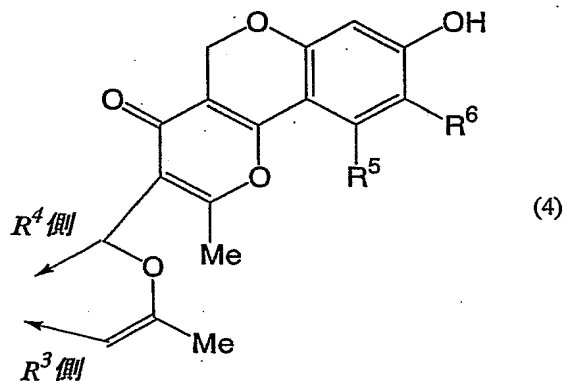
[II] R^3 および R^4 は結合して、式(3)：



(式中、 R^5 および R^6 は前記と同義である。)

で表される2価基を表す。

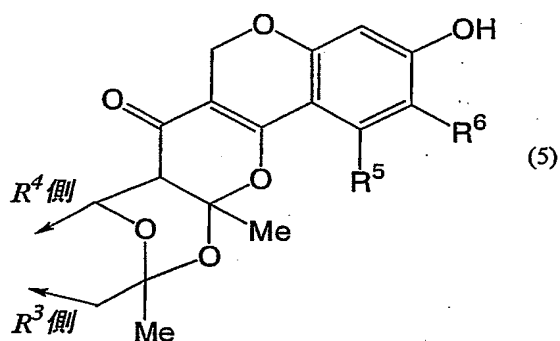
[III] R^3 および R^4 は結合して、式(4) :



(式中、 R^5 および R^6 は前記と同義である。)

で表される2価基を表す。

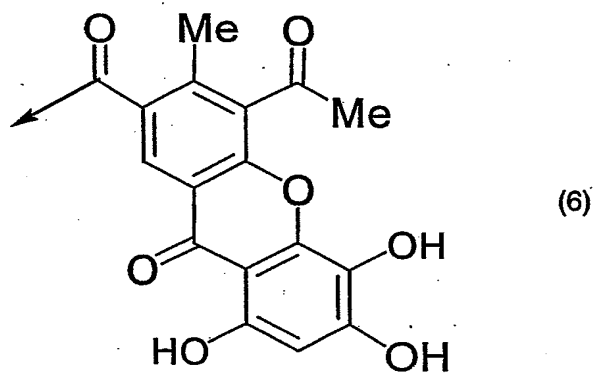
5 [IV] R^3 および R^4 は結合して、式(5) :



[式中、 R^5 および R^6 は前記と同義である。]

で表される2価基を表す。

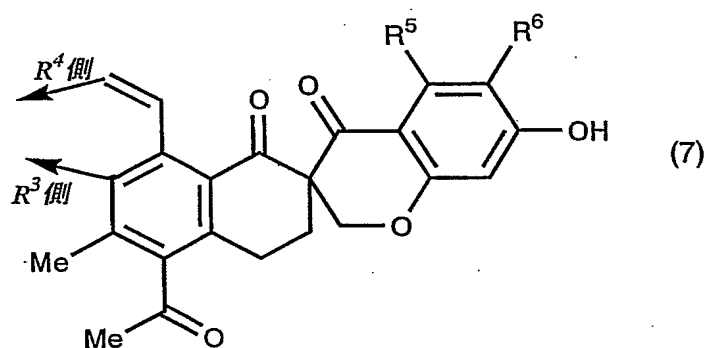
[V] R^3 は水素原子を表し、 R^4 は式(6) :



10

で表される基を表す。

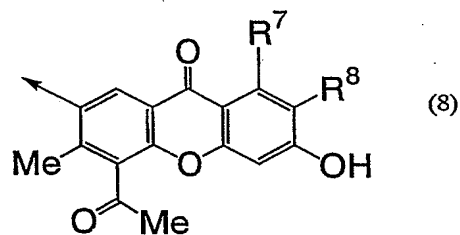
[VI] R^3 および R^4 は結合して、式(7) :



(式中、 R^5 および R^6 は前記と同義である。)

で表される2価基を表す。

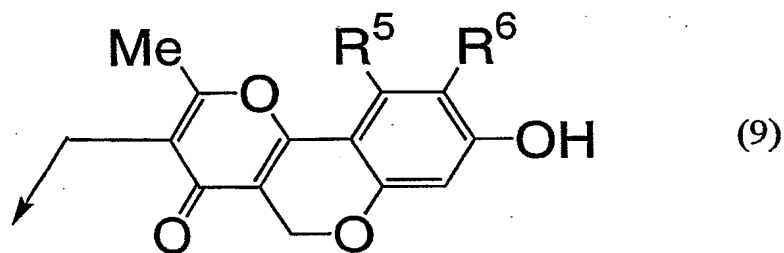
[VII] R^3 は式(8)：



5

(式中、 R^7 は水素原子またはカルボキシル基を表し、 R^8 は水素原子または水酸基を表す。)

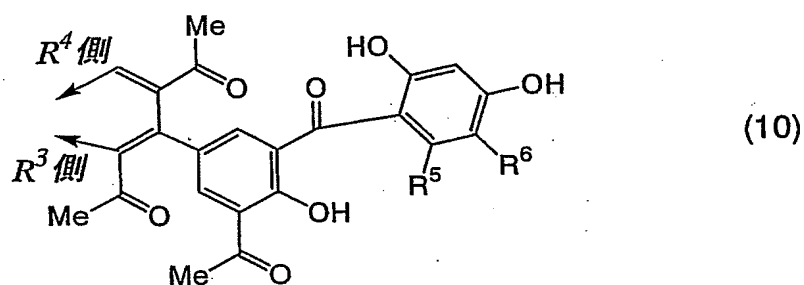
で表される基を表し、 R^4 は式(9)：



10 (式中、 R^5 及び R^6 は前記と同義である。)

で表される基を表す。

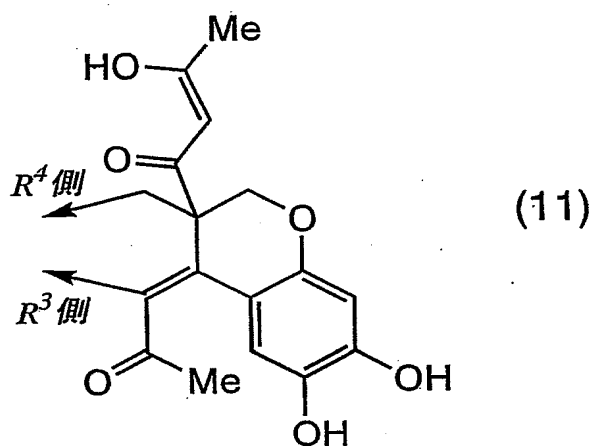
[VIII] R^3 および R^4 は結合して、式(10)：



(式中、 R^5 および R^6 は前記と同義である。)

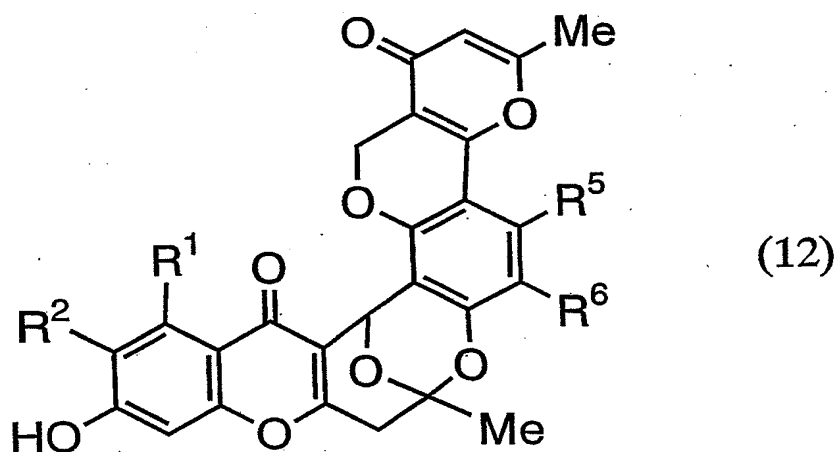
で表される2価基を表す。

[IX] R^3 および R^4 は結合して、式(11)：



で表される2価基を表す。]

2. 一般式(12)：



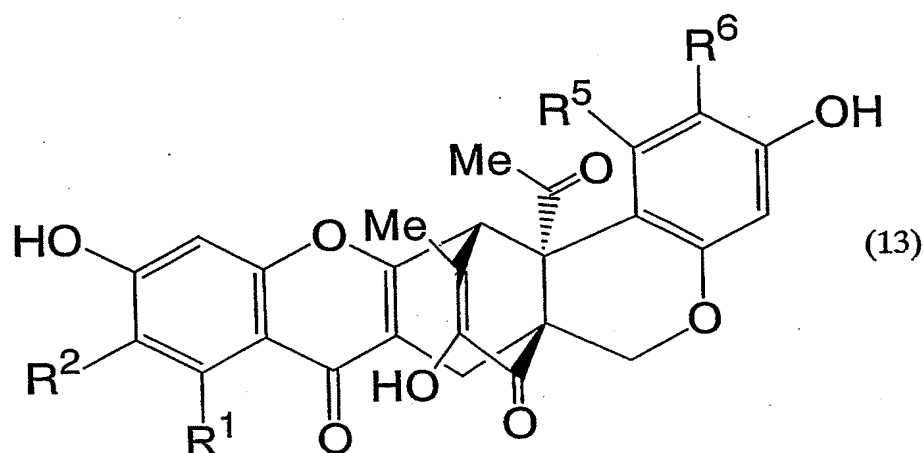
(式中、 R^1 、 R^2 、 R^5 および R^6 は、請求項1と同義である。)

10 で表される、請求項1記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

3. 一般式(12)において、 R^1 および R^5 が、カルボキシル基であり、 R^2 が水

酸基又は水素原子であり、 R^6 が水酸基である、請求項2記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

4. 一般式(13)：

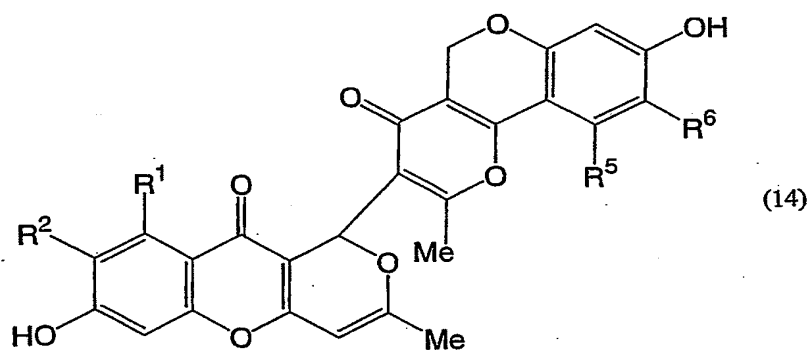


(式中、 R^1 、 R^2 、 R^5 および R^6 は請求項1と同義である。)

で表される、請求項1記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

5. 一般式(13)において、 R^1 および R^5 がカルボキシ基であり、 R^2 および R^6 が水酸基である、請求項4記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

6. 一般式(14)：



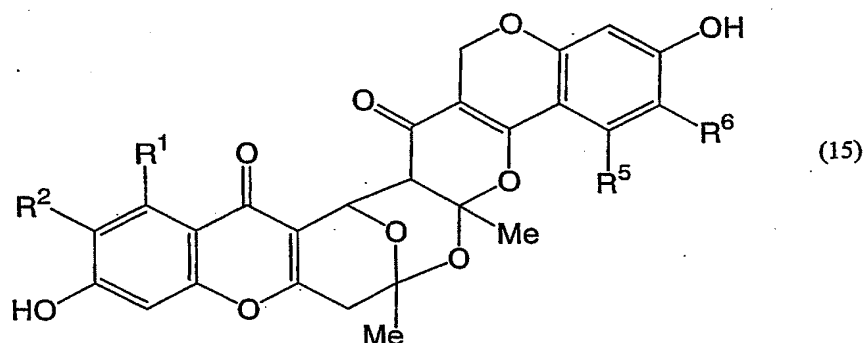
[式中、 R^1 、 R^2 、 R^5 および R^6 は請求項1と同義である。]

で表される請求項1記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

7. 一般式(14)において、 R^1 および R^5 がカルボキシ基であり、 R^2 および

R⁶が水酸基である、請求項6記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

8. 一般式(15) :



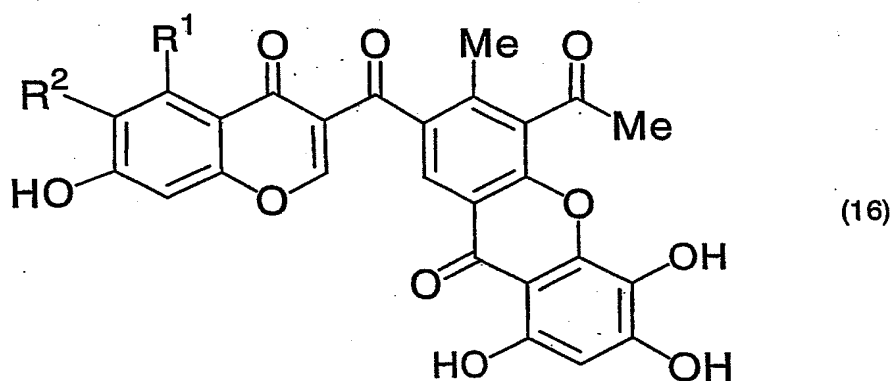
5 (式中、R¹、R²、R⁵およびR⁶は請求項1と同義である。)

で表される請求項1記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

9. 一般式(15)において、R¹およびR⁵がカルボキシ基であり、R²およびR⁶が水酸基である、請求項8記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

10. 一般式(16) :

10



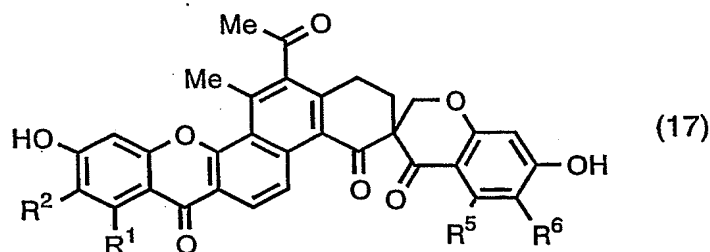
(式中、R¹およびR²は請求項1と同義である。)

で表される請求項1記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

11. 一般式(16)において、R¹が、カルボキシ基を表し、R²が、水酸基を

15 表す請求項10記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

12. 一般式(17) :

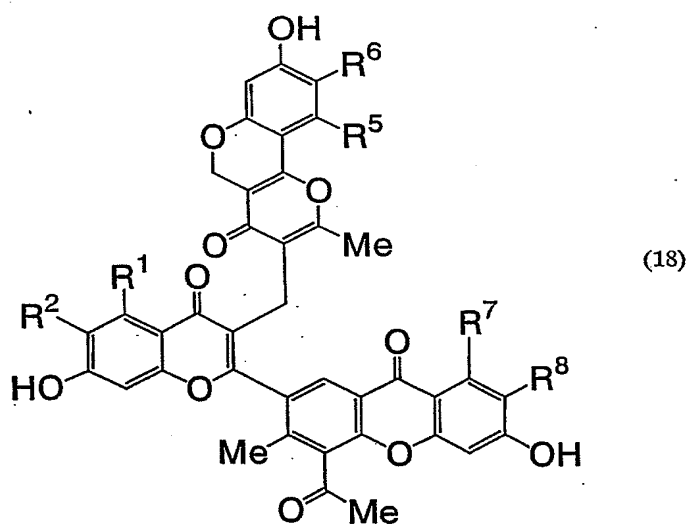


(式中、 R^1 、 R^2 、 R^5 及び R^6 は、請求項1と同義である。)

で表される請求項1記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

- 5 13. 一般式(17)において、 R^1 および R^5 がカルボキシ基を表し、 R^2 および R^6 が水酸基を表す、請求項11記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

14. 一般式(18)：



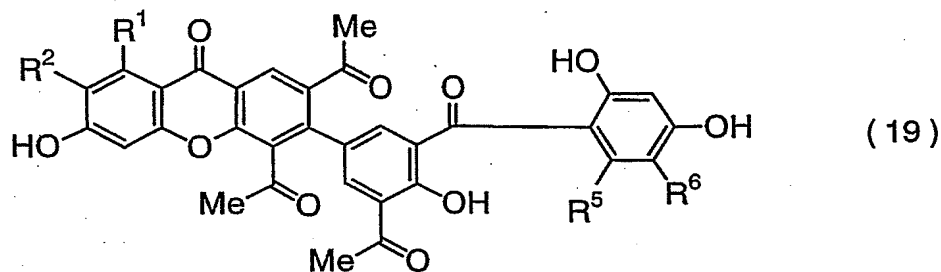
- 10 (式中、 R^1 、 R^2 、 R^5 、 R^6 、 R^7 および R^8 は請求項1と同義である。)

で表される請求項1記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

15. 一般式(18)において、 R^1 および R^5 はカルボキシ基であり、 R^2 、 R^6 および R^8 が水酸基である、請求項14記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

- 15 16. 一般式(18)において、 R^7 が水素原子である、請求項15記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

17. 一般式 (19) :



(式中、R¹、R²、R⁵およびR⁶は請求項1と同義である。)

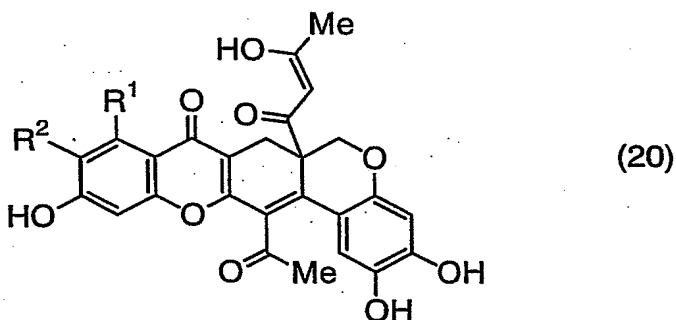
で表される請求項1記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

5 18. 一般式 (19) において、R²およびR⁶が水酸基である、請求項17記載の化合物、又はその薬学上許容される塩。

19. 一般式 (19) において、R⁵がカルボキシル基である、請求項18記載の化合物、又はその薬学上許容される塩。

10 20. 一般式 (19) において、R¹がカルボキシル基である、請求項19記載の化合物、又はその薬学上許容される塩。

21. 一般式 (20) :



(式中、R¹及びR²は、請求項1と同義である。)

で表される請求項1記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

15 22. 一般式 (20) において、R¹がカルボキシル基であり、R²が水酸基である、請求項21記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

23. ペニシリウム属に属するSPF-3059株より得ることができ、下記の物理的性質および化学的性質を有し、かつセマフォリン阻害活性を有する化合物。

(a) 高速電子衝撃質量スペクトル m/z 値 $(M+H)^+$: 545 ;

(b) 分子式 : $C_{28}H_{16}O_{12}$;

(c) 紫外可視吸収スペクトル λ_{max} (メタノール中) $nm(\epsilon)$: 213(41700)、286(29500)、338sh(14900)、429sh(6500) ;

5 (d) 赤外吸収スペクトル ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3358、3073、1700、1674、1631、1464、1276、1248 ;

(e) 1H 核磁気共鳴スペクトル(DMSO-d6中、500MHz) : スペクトルのチャート
トを第1図に示す ;

(f) ^{13}C 核磁気共鳴スペクトル(DMSO-d6中、125MHz) : スペクトルのチャート
10 トを第2図に示す ;

24. ペニシリウム属に属するSPF-3059株より得ることができ、下記の物理的性質および化学的性質を有し、かつセマフォリン阻害活性を有する化合物。

(a) 高速電子衝撃質量スペクトル m/z 値 $(M+H)^+$: 561 ;

(b) 分子式 : $C_{28}H_{16}O_{13}$;

15 (c) 紫外可視吸収スペクトル λ_{max} (メタノール中) $nm(\epsilon)$: 219(34300)、257(28900)、311(28600)、404(14600)、450(14400) ;

(d) 赤外吸収スペクトル ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3154、1657、1605、1468、1279 ;

(e) 1H 核磁気共鳴スペクトル(DMSO-d6中、500MHz) : スペクトルのチャート
20 トを第3図に示す ;

(f) ^{13}C 核磁気共鳴スペクトル(DMSO-d6中、125MHz) : スペクトルのチャート
トを第4図に示す ;

25. ペニシリウム属に属するSPF-3059株より得ることができ、下記の物理的性質および化学的性質を有し、かつセマフォリン阻害活性を有する化合物。

25 (a) 高速電子衝撃質量スペクトル m/z 値 $(M+H)^+$: 669 ;

(b) 分子式 : $C_{34}H_{20}O_{15}$;

(c) 紫外可視吸収スペクトル λ_{max} (メタノール中) $nm(\epsilon)$: 213(5460

0)、235sh(39400)、312(31300)、350(24200) ;

(d) 赤外吸収スペクトル ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 3348、1766、1707、1644、1588、1464、1301 ;

5 (e) ^1H 核磁気共鳴スペクトル(DMSO-d6中、500MHz) : スペクトルのチャート
トを第5図に示す ;

(f) ^{13}C 核磁気共鳴スペクトル(DMSO-d6中、125MHz) : スペクトルのチャート
トを第6図に示す ;

26. ペニシリウム属に属するSPF-3059株より得ることができ、下記の物理的性質
および化学的性質を有し、かつセマフォリン阻害活性を有する化合物。

10 (a) 高速電子衝撃質量スペクトル m/z 値 ($\text{M}+\text{H}$) $^{+}$: 549 ;

(b) 分子式 : $\text{C}_{28}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$;

(c) 紫外可視吸収スペクトル λ_{\max} (メタノール中) nm (ϵ) : 227(30200)、282sh(13500)、315(13900)、356(11000) ;

15 (d) 赤外吸収スペクトル ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 3396、1688、1662、1622、
1470、1294 ;

(e) ^1H 核磁気共鳴スペクトル(DMSO-d6中、500MHz) : スペクトルのチャート
トを第7図に示す ;

(f) ^{13}C 核磁気共鳴スペクトル(DMSO-d6中、125MHz) : スペクトルのチャート
トを第8図に示す ;

20 27. 請求項1~26のいずれか記載の化合物、またはその薬学上許容される塩を
有効成分として含有することを特徴とするセマフォリン阻害剤。

28. セマフォリンが、クラス3型セマフォリンであることを特徴とする、請求項
27記載のセマフォリン阻害剤。

29. クラス3型セマフォリンが、セマフォリン3Aであることを特徴とする、請
25 求項28記載のセマフォリン阻害剤。

30. 請求項27~29のいずれか記載のセマフォリン阻害剤を有効成分として含
有することを特徴とする、神経伸長反発因子阻害剤。

3 1. 請求項 2 7～2 9 のいずれか記載のセマフォリン阻害剤を有効成分として含有することを特徴とする、成長円錐退縮活性及び／又はコラーゲンゲル中での神経伸長阻害活性の抑制作用を有する薬剤。

5 3 2. 請求項 2 7～2 9 のいずれか記載のセマフォリン阻害剤を有効成分として含有することを特徴とする、神経再生促進剤。

3 3. 請求項 2 7～2 9 のいずれか記載のセマフォリン阻害剤を有効成分として含有することを特徴とする神経障害疾患及び／又は神経変性疾患の予防若しくは治療剤。

10 3 4. 請求項 2 7～2 9 のいずれか記載のセマフォリン阻害剤を有効成分として含有することを特徴とする、脊髄神経の損傷及び／又は末梢神経の損傷を伴う疾患の予防若しくは治療剤。

15 3 5. 請求項 2 7～2 9 のいずれか記載のセマフォリン阻害剤を有効成分として含有することを特徴とする、嗅覚異常症、外傷性神経傷害、脳梗塞性神経障害、顔面神経麻痺、糖尿病性神経症、緑内障、網膜色素変性症、アルツハイマー病、パーキンソン病、神経変性疾患、筋發育不全性側索硬化症、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病、脳梗塞、又は外傷性神経変性疾患の予防若しくは治療剤。

3 6. ペニシリウム属に属する微生物を培養して、その培養物から化合物を採取することを特徴とする、請求項 1～2 6 のいずれか記載の化合物、またはその薬学上許容される塩の製造方法。

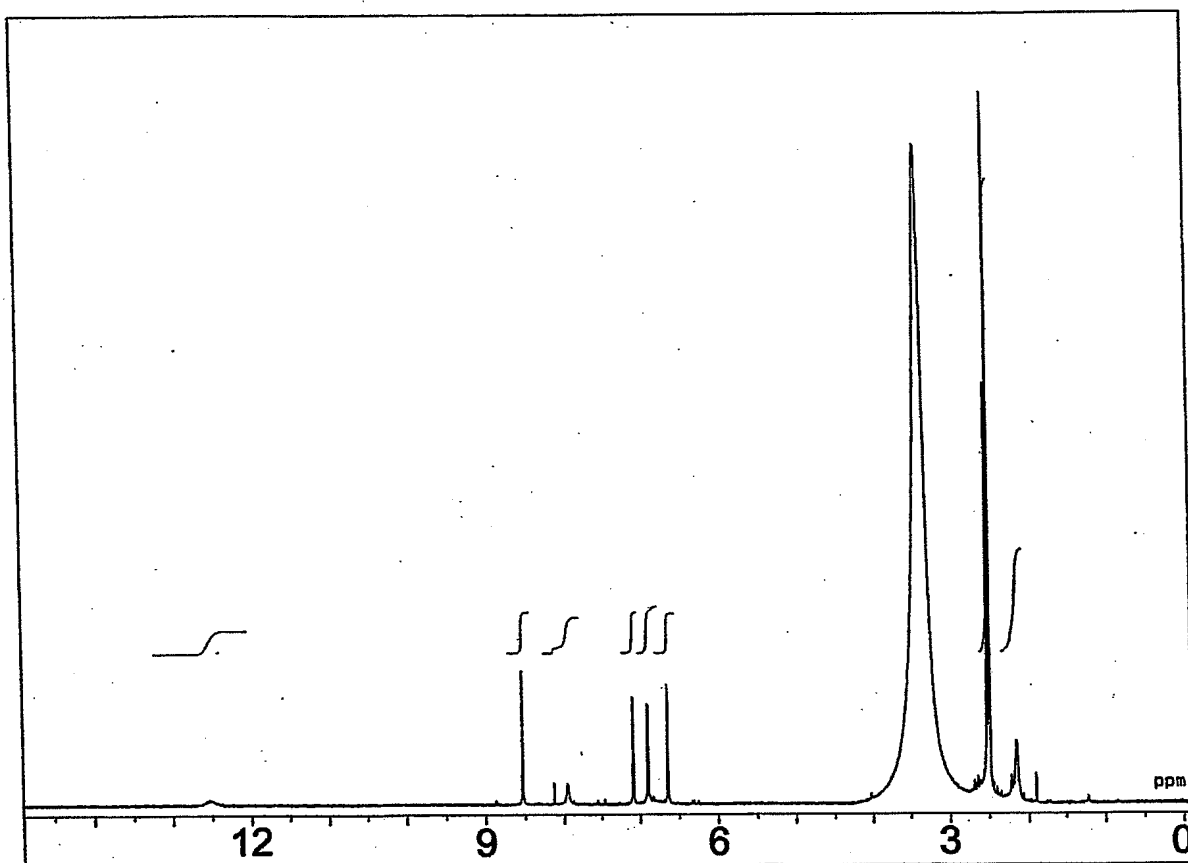
20 3 7. ペニシリウム属に属する微生物が、ペニシリウム・エスピー

(*Penicillium* sp.) S P F - 3 0 5 9 株であることを特徴とする請求項 3 6 記載の製造方法。

1/8

図 面

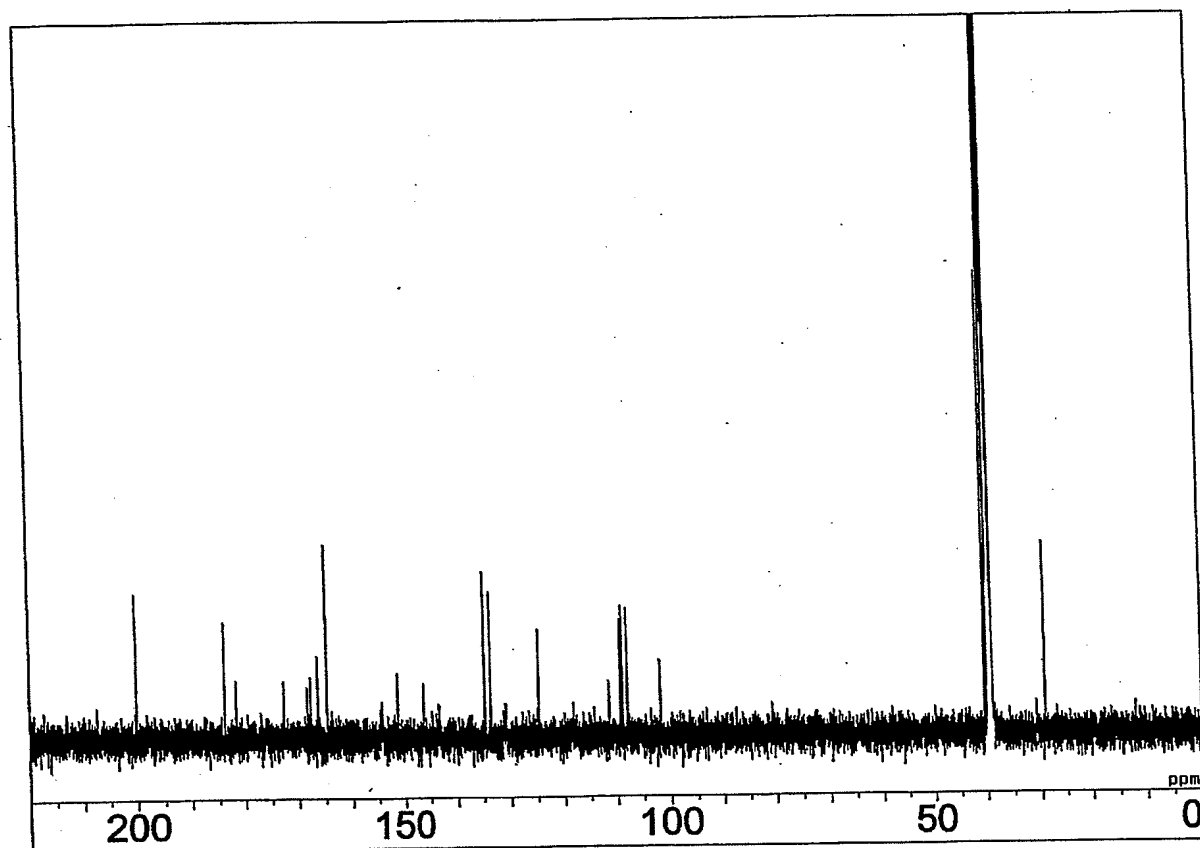
第1図



差替え用紙（規則26）

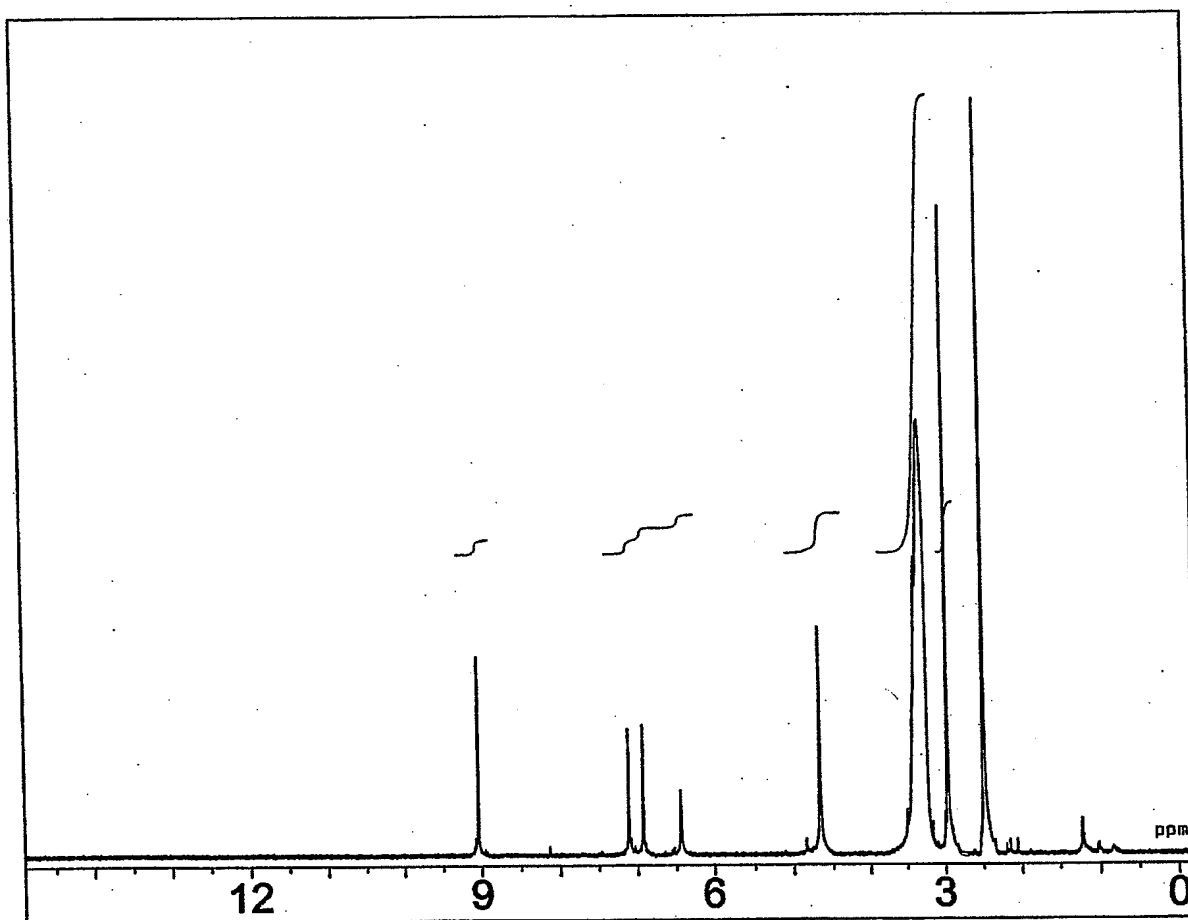
2 / 8

第 2 図



3/8

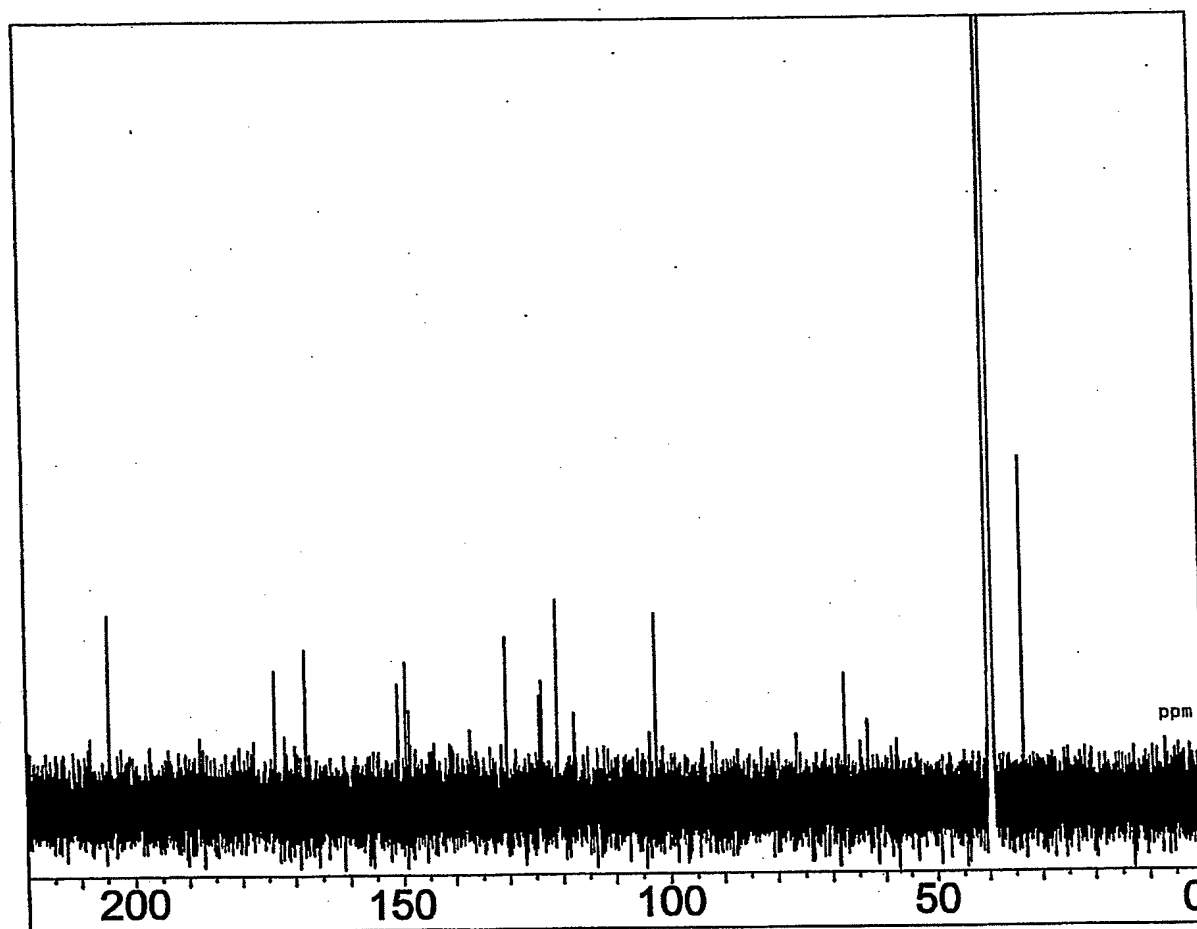
第3図



差替え用紙（規則26）

4/8

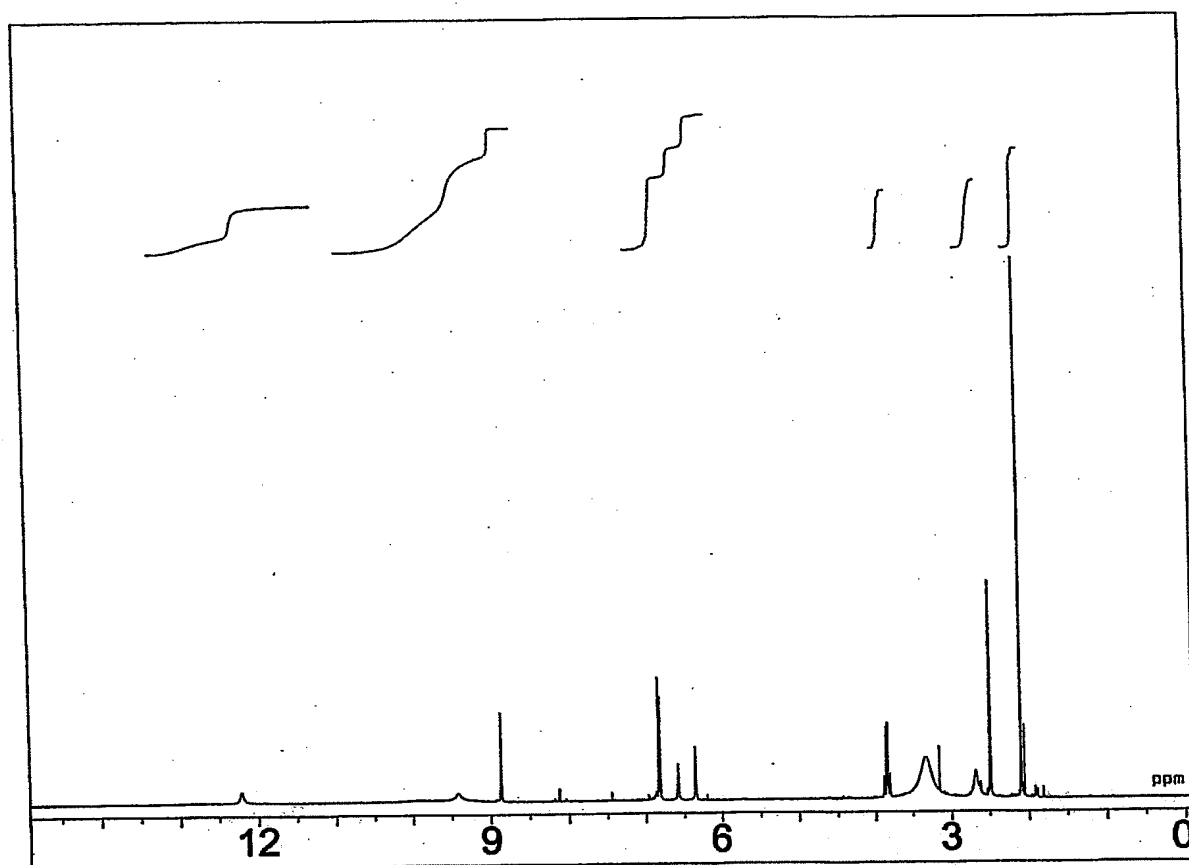
第4図



差替え用紙（規則26）

5/8

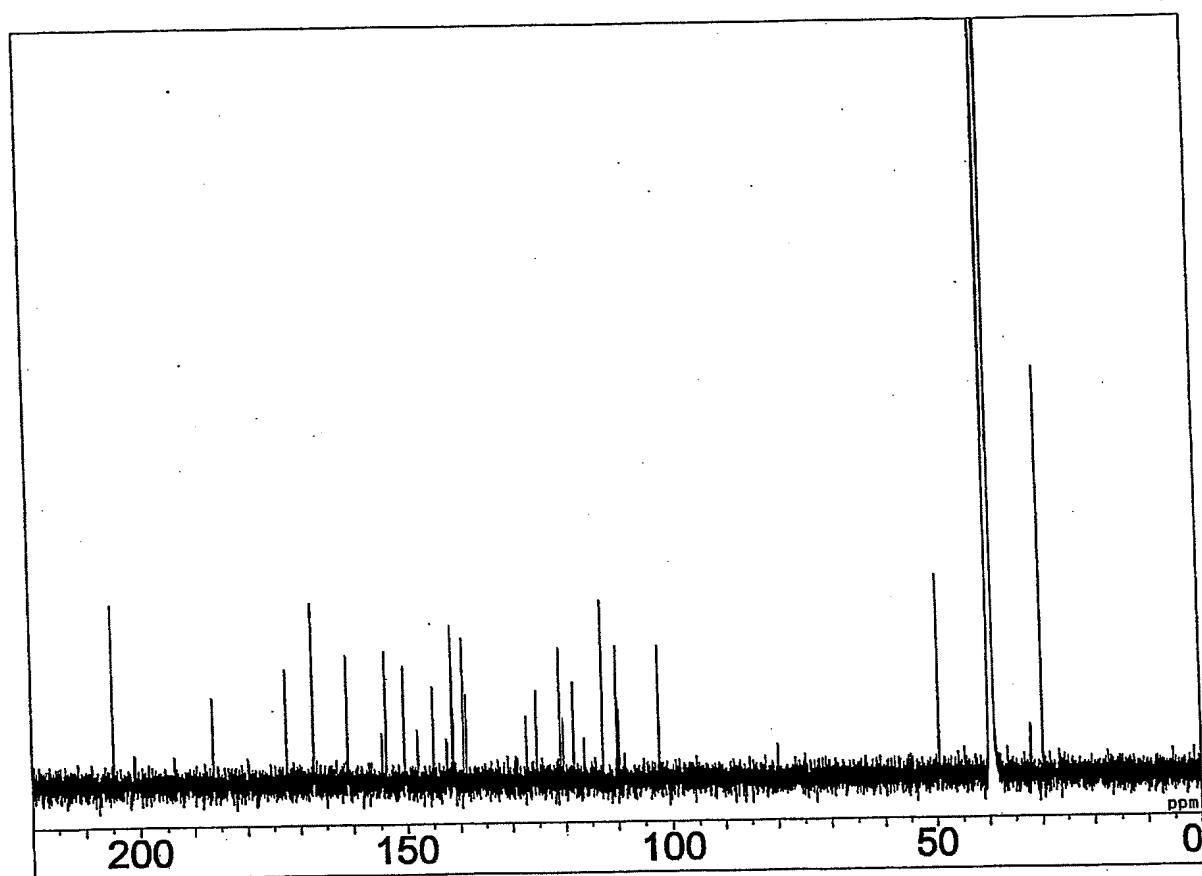
第5図



差替え用紙（規則26）

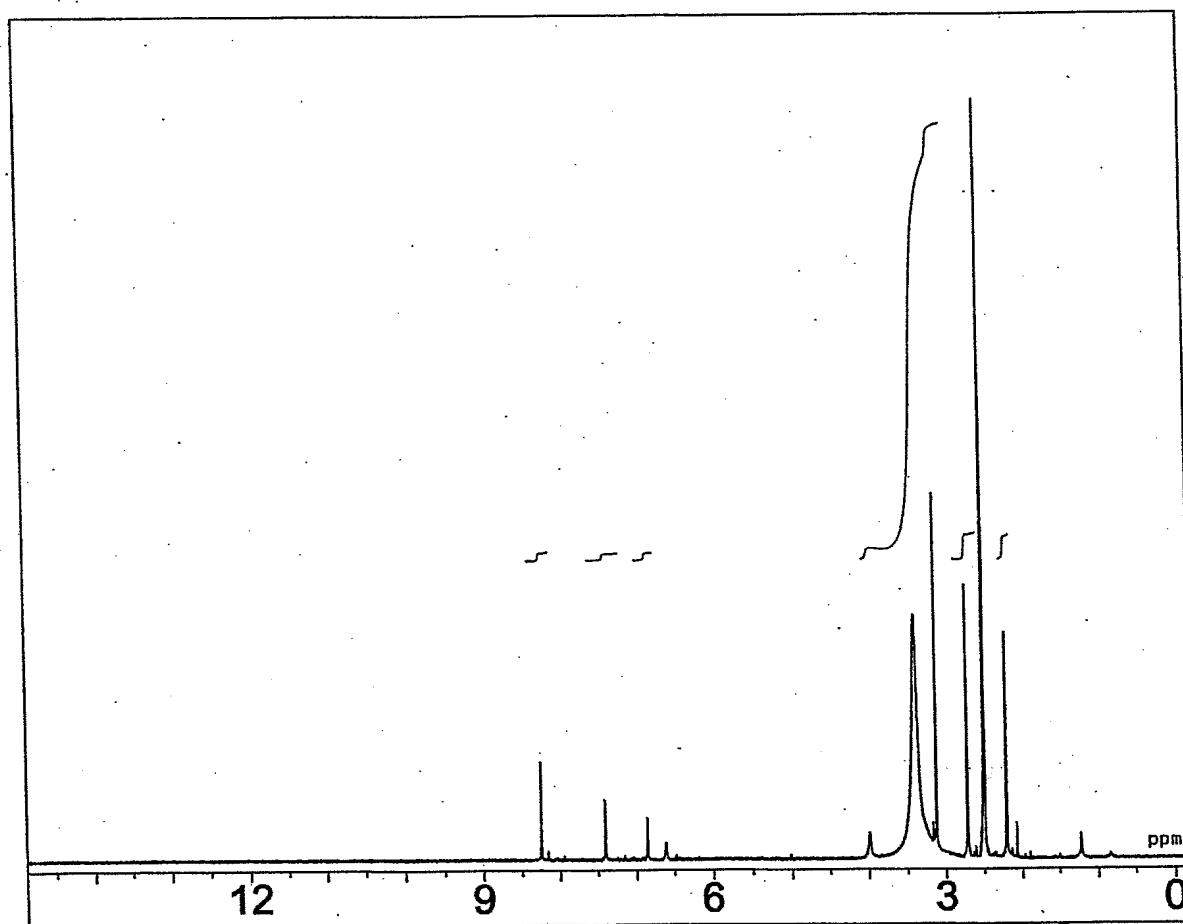
6 / 8

第6図



7/8

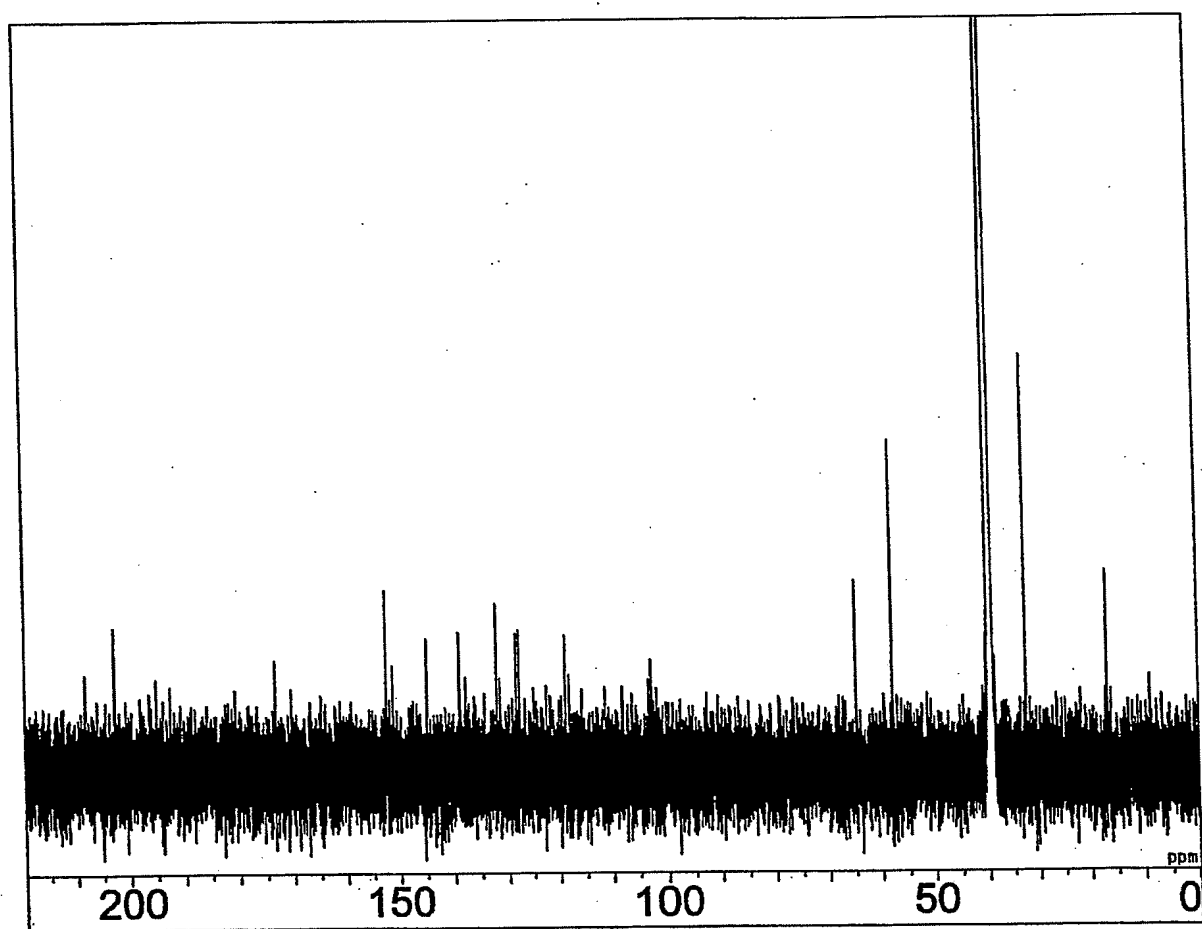
第7図



差替え用紙（規則26）

8 / 8

第 8 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/00567

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07D493/22, 311/86, 493/04, 493/08, 493/10, A61K31/35, 31/352, A61P9/10, 25/00, 25/14, 25/16, 25/28, 27/06, 43/00, C12P17/18 // C07M7:00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07D493/22, 311/86, 493/04, 493/08, 493/10, A61K31/35, 31/352, A61P9/10, 25/00, 25/14, 25/16, 25/28, 27/06, 43/00, C12P17/18 // C07M7:00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN), BIOSIS/WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5416197 A (TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA), 16 May, 1995 (16.05.95), Full text (Family: none)	1-3, 27-37
A	WO 98/15628 A1 (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), 16 April, 1998 (16.04.98), Full text & EP 945505 A1 & JP 10-517376 A	1-3, 27-37
A	WO 98/11216 A1 (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), 19 March, 1998 (19.03.98), Full text & EP 960937 A1 & JP 10-513487 A	1-3, 27-37

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07 May, 2003 (07.05.03)

Date of mailing of the international search report
20 May, 2003 (20.05.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/00567

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GOSHIMA Y. et al., Functions of semaphorins in axon guidance and neuronal regeneration, Jpn.J. Pharmacol., 2000, 82(4), p.273-9	1-3,27-37
P,A	WO 02/09756 A1 (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), 07 February, 2002 (07.02.02), Full text (Family: none)	1-3,27-37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/00567

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

(See extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Parts of claims 1-3, 27-37 relating to compounds of the general formula (1) wherein R³ and R⁴ are groups represented by formula [I].

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/00567

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

A. The claims are classified into the following groups of inventions:

- [1] parts relating to compounds of the general formula (1) wherein R^3 and R^4 are groups represented by formula [I] (claims 1-3, 27-37),
- [2] parts relating to compounds of the general formula (1) wherein R^3 and R^4 are groups represented by formula [II] (claims 1, 4-5, 27-37),
- [3] parts relating to compounds of the general formula (1) wherein R^3 and R^4 are groups represented by formula [III] (claims 1, 6-7, 27-37),
- [4] parts relating to compounds of the general formula (1) wherein R^3 and R^4 are groups represented by formula [IV] (claims 1, 8-9, 27-37),
- [5] parts relating to compounds of the general formula (1) wherein R^3 and R^4 are groups represented by formula [V] (claims 1, 10-11, 27-37),
- [6] parts relating to compounds of the general formula (1) wherein R^3 and R^4 are groups represented by formula [VI] (claims 1, 12-13, 27-37),
- [7] parts relating to compounds of the general formula (1) wherein R^3 and R^4 are groups represented by formula [VII] (claims 1, 14-16, 27-37),
- [8] parts relating to compounds of the general formula (1) wherein R^3 and R^4 are groups represented by formula [VIII] (claims 1, 17-20, 27-37),
- [9] parts relating to compounds of the general formula (1) wherein R^3 and R^4 are groups represented by formula [IX] (claims 1, 21-22, 27-37),
- [10] parts relating to compounds of claim 23 (claims 23, 27-37),
- [11] parts relating to compounds of claim 24 (claims 24, 27-37),
- [12] parts relating to compounds of claim 25 (claims 25, 27-37), and
- [13] parts relating to compounds of claim 26 (claims 26-37).

The matter common to the above groups of inventions is a compound represented by the general formula (1).

As a result of search, however, compounds represented by the general formula (1) are disclosed in JP 59-108778 A. Therefore, the above common matter has been disclosed in the above document, thus being not novel.

Thus, the common matter is still a matter of prior art and is not a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2, second sentence.

Accordingly, there is no matter common to all of the claims. Further, there is no other common matter considered as a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2, second sentence, and no technical relationship within the meaning of PCT Rule 13 can be found among those inventions.

Such being the case, the groups of inventions do not comply with the requirement of unity of invention.

B. The invention first mentioned in the claims corresponds to parts of claims 1-3, 27-37 relating to compounds of the general formula (1) wherein R^3 and R^4 are groups represented by formula [I].

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07D493/22, 311/86, 493/04, 493/08, 493/10, A61K31/35, 31/352, A61P9/10, 25/00, 25/14, 25/16, 25/28, 27/06, 43/00, C12P17/18 // C07M7:00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07D493/22, 311/86, 493/04, 493/08, 493/10, A61K31/35, 31/352, A61P9/10, 25/00, 25/14, 25/16, 25/28, 27/06, 43/00, C12P17/18 // C07M7:00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CA(STN), REGISTRY(STN), BIOSIS/WPI(DIALOG), JSTPlus(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	US 5416197 A(TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 1995. 05. 16, 全文(ファミリーなし)	1-3, 27-37
A	WO 98/15628 A1(住友製薬株式会社)1998. 04. 16, 全文 & EP 945505 A1 & JP 10-517376 A	1-3, 27-37
A	WO 98/11216 A1(住友製薬株式会社)1998. 03. 19, 全文 & EP 960937 A1 & JP 10-513487 A	1-3, 27-37

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07. 05. 03

国際調査報告の発送日

20.05.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
本間 夏子



4B 3131

電話番号 03-3581-1101 内線 3447

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	GOSHIMA Y. et al., Functions of semaphorins in axon guidance and neuronal regeneration Jpn. J. Pharmacol., 2000, 82(4), p. 273-9	1-3, 27-37
PA	WO 02/09756 A1 (住友製薬株式会社) 2002. 02. 07, 全文 (ファミリーなし)	1-3, 27-37

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

特別ページ参照。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。
請求の範囲1-3, 27-37のうち、本願の一般式(1)で表される化合物のR³およびR⁴が本願の[I]で表される化合物に係る部分

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(1)) (1998年7月)

A. 請求項は次の発明群に分けられる。

- ①本願の一般式(1)で表される化合物の R^3 および R^4 が本願の[I]で表される化合物に係る部分(請求の範囲1-3, 27-37)
 - ②上記(1)で表される化合物の R^3 および R^4 が本願の[II]で表される化合物に係る部分(請求の範囲1, 4-5, 27-37)
 - ③上記(1)で表される化合物の R^3 および R^4 が本願の[III]で表される化合物に係る部分(請求の範囲1, 6-7, 27-37)
 - ④上記(1)で表される化合物の R^3 および R^4 が本願の[IV]で表される化合物に係る部分(請求の範囲1, 8-9, 27-37)
 - ⑤上記(1)で表される化合物の R^3 および R^4 が本願の[V]で表される化合物に係る部分(請求の範囲1, 10-11, 27-37)
 - ⑥上記(1)で表される化合物の R^3 および R^4 が本願の[VI]で表される化合物に係る部分(請求の範囲1, 12-13, 27-37)
 - ⑦上記(1)で表される化合物の R^3 および R^4 が本願的[VII]で表される化合物に係る部分(請求の範囲1, 14-16, 27-37)
 - ⑧上記(1)で表される化合物の R^3 および R^4 が本願的[VIII]で表される化合物に係る部分(請求の範囲1, 17-20, 27-37)
 - ⑨上記(1)で表される化合物の R^3 および R^4 が本願的[IX]で表される化合物に係る部分(請求の範囲1, 21-22, 27-37)
 - ⑩請求の範囲23に係る化合物に係る部分(請求の範囲23, 27-37)
 - ⑪請求の範囲24に係る化合物に係る部分(請求の範囲24, 27-37)
 - ⑫請求の範囲25に係る化合物に係る部分(請求の範囲25, 27-37)
- 及び
- ⑬請求の範囲26に係る化合物に係る部分(請求の範囲26-37)

上記発明群に共通の事項は、上記(1)で表される化合物であると認められる。

しかし、調査の結果、JP 59-108778 Aには、上記(1)で表される化合物が開示されているので、上記共通事項は、前記文献に記載されており、新規でないことが明らかとなった。

即ち、上記共通事項は先行技術の域を出ないので、PCT規則13.2の第2文の意味における特別な技術的特徴ではない。

それ故、請求の範囲全てに共通の事項はない。PCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の共通の事項は存在しないので、それらの相違する発明の間にPCT規則13の意味における技術的な関連を見いだすことはできない。

よって、上記発明群は単一性の要件を満たしていない。

B. 請求の範囲に最初に記載されている発明に係る部分は、請求の範囲1-3, 27-37のうち、上記(1)で表される化合物の R^3 および R^4 が本願的[I]で表される化合物に係る部分である。